



Universidad Andrés Bello

Facultad de Ciencias de la Vida

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

**“Rol de las rutas de señalización Gs y Gq reguladas por el R-KDEL en la
activación de autofagia y fusión de autofagosomas con lisosomas”**

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al Grado de Magister en
Biotecnología

Director de Tesis:

Dr. Jorge A. Cancino Henríquez

Tomás Eduardo Jiménez Miranda

Viña del Mar, Chile.

Enero, 2019



Universidad Andrés Bello

Facultad de Ciencias de la Vida

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

“Rol de las rutas de señalización Gs y Gq reguladas por el R-KDEL en la activación de autofagia y fusión de autofagosomas con lisosomas”

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al Grado de Magister en
Biotecnología

Director de Tesis:

Dr. Jorge A. Cancino Henríquez

Centro de Biología Celular y Biomedicina

Universidad San Sebastián

Tomás Eduardo Jiménez Miranda

Viña del Mar, Chile.

Enero, 2019



Facultad de Ciencias de la Vida
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

**“Rol de las rutas de señalización Gs y Gq reguladas por el R-KDEL en la
activación de autofagia y fusión de autofagosomas con lisosomas”**

Tomás Eduardo Jiménez Miranda

Este trabajo fue elaborado bajo la supervisión del Director de Tesis de Magister Dr. Jorge Cancino, Centro de Biología Celular y Biomedicina, Universidad San Sebastián.

Prof. Jorge Cancino

Director

Dra. M. Isabel Oliver

Comisión Evaluadora

Dra. Lorena Varela

Comisión Evaluadora

Dra. M. Isabel Oliver P

Directora de Carrera Ingeniería en Biotecnología

Viña del Mar, Chile. Enero 2019

DEDICATORIA

*La grandeza del universo sería ignorada sin nuestra consciencia,
así como su comprensión sin la ciencia.*

AGRADECIMIENTOS

Mis agradecimientos van a mi familia, a mis amigos, a mi tutor y a toda la gente que me ha apoyado y colaborado para poder culminar este proceso. Esta tesis fue financiada por el proyecto FONDECYT N°1150986.

ÍNDICE

1.	RESUMEN	1
1.1.	ABSTRACT.....	2
2.	INTRODUCCIÓN	3
2.1.	Rol de la señalización del R-KDEL en el transporte de membranas y homeostasis celular.	3
2.2.	Función de los lisosomas y su rol en la homeostasis celular.....	9
2.3.	Autofagia y reposicionamiento de lisosomas.....	10
2.4.	Complejo dineína y su importancia en el movimiento de lisosomas	12
2.5.	Vía de señalización del R-KDEL como regulador de autofagia y función lisosomal...	13
3.	HIPÓTESIS	15
4.	OBJETIVOS	16
4.1.	Objetivo general:.....	16
4.2.	Objetivos específicos:	16
5.	METODOLOGÍA.....	17
5.1.	Estrategia general y herramientas.....	17
5.1.1.	Péptidos membrana-permeable.	17
5.1.2.	Marcador de autofagia LC3.....	17
5.1.3.	Modelos celulares.	18
5.1.4.	Estado nutritivo.	20
5.1.5.	Microscopía de fluorescencia.....	20
5.1.6.	Transfección de DynLRB1-HA & LC3-mCherry-GFP con TransIT-LT1	20
5.2.	Diseño experimental para rol de la señalización del R-KDEL en la activación de autofagia en condiciones nutritivas óptimas.	21
5.2.1.	Condicionamiento de estado nutritivo óptimo.....	21
5.2.2.	Tratamiento con activadores e inhibidores.....	22
5.2.3.	Visualización de efecto de modulación de señalización del R-KDEL en activación de autofagia.	22

5.4.	Diseño experimental evaluación de fosforilación de DynLRB1.....	23
6.	RESULTADOS	24
6.1.1.	Activación de ruta de señalización del R-KDEL promueve el flujo autofágico. ...	24
6.1.2.	Vía de señalización del R-KDEL modula la fusión de autofagosomas con lisosomas.....	27
6.1.3.	Fosforilación de DynLRB1 favorece la fusión de autofagosomas con lisosomas	29
7.	DISCUSIÓN	34
8.	CONCLUSIONES.....	38
9.	PROYECCIONES	39
10.	REFERENCIAS.....	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vía de señalización de R-KDEL	6
Figura 2. Efecto de la activación del R-KDEL en la localización subcelular de lisosomas y organelos relacionados.	8
Figura 3. Esquema de flujo de autofagia	11
Figura 4. Diagrama de flujo de autofagia a nivel de emisión de fluorescencia en diferentes estructuras con marcador LC3 conjugado con mCherry y GFP	19
Figura 5. Inducción de autofagia por activación de vía de señalización del R-KDEL.....	34
Figura 6. Cuantificación de células autofágicas por activación del R-KDEL	25
Figura 7. Fusión de autofagosomas con lisosomas por activación de R-KDEL	26
Figura 8. Activación de R-KDEL induce la fusión de autofagosomas y lisosomas.....	28
Figura 9. Fosforilación de DynLRB1 favorece la formación de autolisosomas.....	30
Figura 10. Cuantificación de autolisosomas & autofagosomas en células expresando LC3-mCherry-GFP y diferentes versiones de DynLRB1	31

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Co-transfección de LC3-mCherry-GFP con mutantes de DynLRB1.....	21
--	----

1. RESUMEN

El transporte intracelular involucra un gran flujo de membranas y proteínas entre el retículo endoplasmático (RE), el aparato de Golgi (AG) y el sistema endo-lisosomal. El AG tiene una función central en la regulación de este proceso debido a su rol en glicosilación, distribución y tráfico. Se ha establecido la existencia de un mecanismo de control de la maquinaria de transporte a cargo del **receptor de KDEL (R-KDEL)**, el cual tiene como rol la detección y regulación de tráfico. El R-KDEL posee rutas de señalización en el AG para dicho fin, sin embargo, esta ruta no se restringe exclusivamente a transporte; ya que **la activación del R-KDEL modula transcripcionalmente un gran número de genes lisosomales, especialmente genes involucrados en autofagia**. Además, estimulaciones breves del R-KDEL generan una respuesta rápida originada y controlada desde el AG la que produce **un aumento del número de lisosomas en la zona del AG**; relocalización que corresponde a un **evento clave que favorece la formación de autolisosomas en el proceso de autofagia**. Se ha demostrado recientemente que dicha relocalización está controlada por el motor molecular de dineína DynLRB1 bajo la regulación del R-KDEL.

Los antecedentes expuestos permitieron plantear la hipótesis de que **“La activación de la ruta de señalización del R-KDEL en el aparato de Golgi promueve el flujo autofágico mediante la regulación del motor molecular Dyn LRB1”**. Por lo tanto, esta tesis tuvo como objetivo **describir el rol de la vía de señalización dependiente del R-KDEL en la activación del flujo autofágico**. Para esto, se utilizaron células de neuroglioma (H4) con la proteína marcadora de autofagia LC3-mCherry-GFP, y diversos péptidos célula-permeables para modular los diferentes intermediarios de la ruta del R-KDEL. También, se co-transfectaron células HeLa con LC3-mCherry-GFP y diferentes mutantes de DynLRB1, para evaluar su implicancia en la fusión de autofagosomas con lisosomas. Encontramos que la activación del R-KDEL induce el flujo autofágico, promoviendo la biogénesis de autofagosomas, además, potencia el flujo autofágico al favorecer la fusión de autofagosomas con lisosomas. Los resultados obtenidos en esta tesis dan cuenta de una estrecha relación entre la maquinaria de regulación de tráfico intracelular y la regulación de autofagia.

1.1. ABSTRACT

Intracellular vesicular transport involves a great flux of membrane and proteins between the endoplasmic reticulum (ER), the Golgi apparatus (GA) and the endo-lysosomal system. The GA has a central function in the regulation of this process due to its role in glycosylation, sorting and traffic. The existence of a control mechanism of the transport machinery has been established in charge of the **KDEL receptor (KDELR)**, which role is the detection and modulation of traffic. The KDELR has signaling pathways in the GA to control these processes, however, this pathway it's not restricted exclusively to transport; **the activation of the KDELR modulates at transcriptional level great number of lysosomal genes, especially genes involved in autophagy**. Also, short stimulations of the KDELR produce a fast response originated and controlled from the GA that causes **an increase in the number of lysosomes in the GA region**; a relocation event which is key to promote the formation of autolysosomes during autophagy. It has been recently demonstrated that such relocation it's controlled by the Dynein molecular motor DynLRB1 under the regulation of KDELR.

The previously exposed background allowed for the proposal of the following hypothesis: **“The activation of KDELR signaling pathway in the AG induces the autophagic flux by regulation of the molecular motor protein DynLRB1”**. Therefore, this thesis had the aim to **describe the role of the KDELR signaling pathway in the activation of the autophagic flux**. For this purpose, neuroglioma cells (H4) were used along with the autophagy marker protein LC3-mCherry-GFP, and diverse cell-permeable peptides, which target and modulate different intermediaries of the KDELR signaling pathway. Also, HeLa cells were co-transfected with LC3-mCherry-GFP and different mutants of DynLRB1, in order to evaluate their impact in the autophagosome-lysosome fusion. It was observed that the KDELR activation induce autophagic flux by promoting the biogenesis of autophagosomes, and also, it potentiates the autophagic flux by favoring the autophagosome-lysosome fusion. The results obtained in this thesis notice a close relationship between the intracellular traffic regulation machinery and autophagy regulation.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Rol de la señalización del R-KDEL en el transporte de membranas y homeostasis celular.

La cantidad de organelos en una célula es un factor importante en su funcionalidad, ya que se encuentra directamente vinculado con la capacidad que tiene la célula de llevar a cabo los procesos fisiológicos que requiere. Por lo tanto, conocer los mecanismos de regulación de la cantidad de dichos organelos y su biogénesis es relevante para comprender la homeostasis celular. El transporte de membranas dentro de la célula es esencial para la regulación de la composición bioquímica de la mayoría de los organelos, incluyendo la membrana plasmática (De Matteis y Luini, 2011). Los flujos de proteínas y de membrana que ingresan a los organelos de transporte pueden variar debido a perturbaciones fisiológicas y patológicas (Hirschberg et al., 1998; Mironov et al., 2001; Pulvirenti et al., 2008; Trucco et al., 2004), lo cual puede ser una grave amenaza para la homeostasis de dichos organelos de transporte. Por lo tanto, la extensión y composición de los flujos de membrana deben ser controlados de forma precisa y balanceada para mantener la homeostasis del sistema endomembranoso (Cancino et al., 2013; Sallese et al., 2006). Se ha planteado que este control se encuentra regulado por diversas moléculas de transducción de señales que residen en el sistema de endomembranas, en particular en el AG, las cuales tienen potentes efectos en el sistema de tráfico intracelular (Cancino y Luini, 2013; Farhan y Rabouille, 2011). Sin embargo, a pesar de su importancia fisiológica, los mecanismos detrás de la organización del transporte de membrana y proteínas mediados por rutas de señalización, aún son poco comprendidos (Cancino y Luini, 2013).

Recientemente, se ha descubierto una nueva característica del AG, la cual consiste en su capacidad de generar señalización autónoma (Pulvirenti et al., 2008) en respuesta a la llegada de cargo desde el RE. El tráfico de llegada al AG es censado por el R-KDEL (Pulvirenti et al., 2008), un receptor de cargo que detecta tráfico de membrana y proteínas a través del reconocimiento de la secuencia aminoacídica consenso de chaperonas acopladas a cargo: Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL). El R-KDEL es conocido por su función de recuperación de chaperonas que salen desde el RE al AG para transportarlas de regreso al RE, y de esta forma mantener la función de plegamiento de proteínas (Lewis y Pelham, 1990, 1992; Lewis et al., 1990; Pelham,

1988). Este receptor tiene una topología de 7 dominios transmembrana (Townsend et al., 1993), e información reciente de modelamiento *in silico* lleva a la propuesta de que el R-KDEL pertenece a la familia de receptores acoplados a proteína G (GPCRs) (Giannotta et al., 2012).

Los GPCRs corresponden a la súper-familia de proteínas más grande en el genoma de mamíferos. Estos receptores comparten una topología de 7 segmentos transmembrana, y median respuestas celulares a una variedad de señales extracelulares, las cuales pueden corresponder desde fotones y pequeñas moléculas hasta péptidos y proteínas (Katrach et al., 2013). La transducción de señales dada por GPCRs es fundamental para la mayoría de los procesos fisiológicos en el cuerpo humano; desde visión, olfato, gusto hasta funciones neurológicas, cardiovasculares, endocrinas y reproductivas; y debido a esto corresponden a uno de los blancos más importantes para la industria farmacéutica (Lagerstrom, 2008). Se sabe que los GPCRs interactúan con las proteínas G heterotriméricas mediante un cambio conformacional en la estructura de estos receptores cuando son activados, sin embargo, la arquitectura molecular del complejo GPCR-Proteína G aún no está del todo definida (Hu et al., 2010). Las proteínas G heterotriméricas están compuestas por 3 subunidades diferentes; α , β , y γ . En todas las proteínas G heterotriméricas la subunidad α se une a nucleótidos de guanina, ya sea GTP o GDP. La unión de GDP mantiene a la subunidad α unida a las subunidades β y γ para formar un trímero inactivo. Cuando una señal es captada por un GPCR, su cambio conformacional permite la unión de la proteína G al receptor, lo cual ocasiona que el GDP se reemplace por GTP. Cuando se tiene GTP unido a la proteína G, la subunidad α se disocia del complejo $\beta\gamma$ y la proteína G se activa. Posterior a esta activación, tanto la subunidad α unida a GTP como el complejo $\beta\gamma$ pueden unirse a un efector río abajo para mediar respuestas en la célula. La inactivación de la GTPasa ocurre por la hidrólisis del GTP a GDP (Purves et al., 2001). Dentro de los blancos comunes de las proteínas G se encuentra la adenilato ciclasa (AC); enzima encargada de catalizar la síntesis de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) (Lefkowitz, 2000).

Recientemente, se ha comprobado que el R-KDEL corresponde a un GPCR (Solis et al., 2017), e interactúa tanto física como funcionalmente con dos proteínas G en el AG: G α_q y G α_s (Giannotta et al., 2012) (por simplicidad de aquí en adelante denominadas G q y G s respectivamente). La activación del R-KDEL inicia la activación

Gq-dependiente de la proteína tirosina-quinasa src (Src) (Giannotta et al., 2012) y la activación Gs-dependiente de la proteína quinasa A (PKA) (Cancino et al., 2014) esto, para promover el tráfico anterógrado y retrógrado desde el AG, respectivamente (Figura 1). La vía Gs/PKA parece ser el principal componente regulador de este mecanismo de señalización, ya que la manipulación del transporte retrógrado por la activación/inhibición de la vía Gs/PKA tiene fuertes efectos en la morfología, tamaño y función del AG, por sobre de la vía Gq/Src (Cancino et al., 2014). Notablemente, la vía de señalización Gs/PKA también posee un control indirecto del tráfico anterógrado del AG, probablemente mediante el control de los niveles de R-KDEL en el AG, regulando así, por ende, la intensidad de la señalización de Gq (Cancino et al., 2014). Por otra parte, el complejo $\beta\gamma$ en el AG (referido de aquí en adelante como $G\beta\gamma$) también posee una ruta de señalización, la cual modula la activación de Proteína Quinasa C (PKC) y Proteína Quinasa D (PKD), teniendo ésta última un rol en el tráfico desde el AG hacia la membrana plasmática (Bossard et al., 2007; Liljedahl et al., 2001). Se ha encontrado recientemente que la señalización mediada por $G\beta\gamma$ es regulada por el R-KDEL (Alberto Luini, comunicación personal).

En los últimos años, el AG ha surgido como un organelo más complejo de lo que se conocía, ya que se ha encontrado su conexión con distintos procesos celulares, más allá de las ya conocidas rutas biosintéticas y de tráfico de membrana (Wilson et al., 2010). Funciones como la homeostasis de lípidos, la respuesta a proteínas mal plegadas, participación en el sistema sensor de nutrientes, apoptosis, puntos de chequeo mitóticos, estrés oxidativo, nucleación de microtúbulos, y ensamble de cromatina, han sido demostradas ser dependientes del AG en algún nivel (Cancino y Luini, 2013; Wilson et al., 2010).

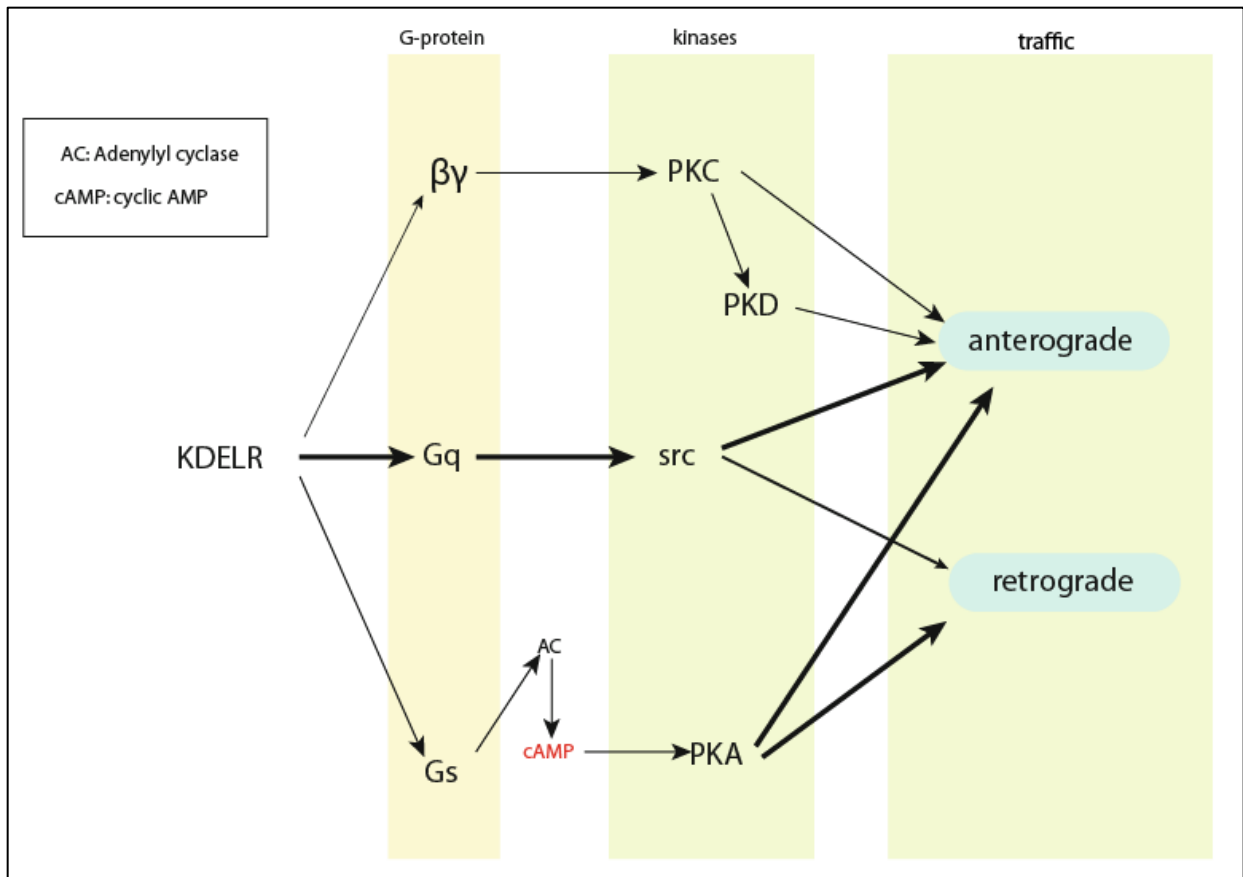


Figura 1. Vía de señalización del R-KDEL.

La activación del receptor gatilla las distintas rutas de señalización mediadas por las proteínas G acopladas a éste. Estas vías comprenden distintas quinasas, las cuales cumplen un rol en la señalización asociada a la regulación del tráfico anterógrado o retrogrado en el aparato de Golgi. El grosor de las flechas denota la cantidad de evidencia disponible para cada conexión en la ruta de señalización.

Modificado de Cancino et al., 2013.

Por lo tanto, es improbable que los roles de las rutas de señalización gatilladas por R-KDEL estén restringidos exclusivamente a la regulación del tráfico del AG; y probablemente regulen una gama de funciones celulares, de la misma manera que los GPCRs que operan a nivel de la membrana plasmática (Cancino y Luini, 2013). De acuerdo con esta hipótesis, mediante experimentos de fosfoproteómica y microarreglo para evaluación de expresión de genes, se ha encontrado que la señalización mediada por R-KDEL posee una regulación sobre el transporte intracelular y también sobre las rutas de señalización de fosfoinosítoles, metabolismo energético y de lípidos (Cancino et al., 2014). Estos experimentos fueron realizados mediante el uso del péptido membrana-permeable BODIPY-KDEL por 6 horas el cual activa al R-KDEL mediante el motivo KDEL, emulando así un pulso de tráfico desde el RE hacia el AG. Esta activación prolongada del R-KDEL induce la regulación positiva de más de 1.300 genes, involucrados en organización y biogénesis de organelos, plegamiento de proteínas y las ya mencionadas funciones de metabolismo de energía y lípidos. Esta regulación transcripcional se encuentra mediada en parte por CREB1, el cual corresponde a un factor transcripcional dependiente de AMPc/PKA, y es probable que otros factores de transcripción también dependientes de AMPc/PKA estén involucrados (Cancino et al., 2014). Un gran número de los genes regulados positivamente pertenecen a genes de organelos asociados con transporte, por ejemplo, RE, AG y al compartimento intermedio del RE (ERGIC) (Cancino et al., 2014). Por lo tanto, la importancia funcional de este mecanismo regulatorio dependiente del R-KDEL parece ser la mantención de la homeostasis del AG a través de la activación del tráfico dependiente de demanda en el AG (Giannotta et al., 2012; Pulvirenti et al., 2008). Sin embargo, un resultado inesperado fue el de la regulación transcripcional del R-KDEL en diversos genes lisosomales, de los cuales cerca del 90% son regulados positivamente, indicando un evidente control de la función lisosomal por parte del R-KDEL (Cancino et al., 2014). Concomitante a este antecedente, se ha encontrado la estimulación del R-KDEL con el péptido BODIPY-KDEL por 15 minutos aumenta el número de lisosomas y de organelos asociados a lisosomas, como cuerpos multivesiculares, en la región del AG, indicando que el efecto en los lisosomas no está restringido a una respuesta transcripcional, sino que también involucra una respuesta rápida originada y controlada desde el AG (Cancino et al., 2014) (Figura 2).

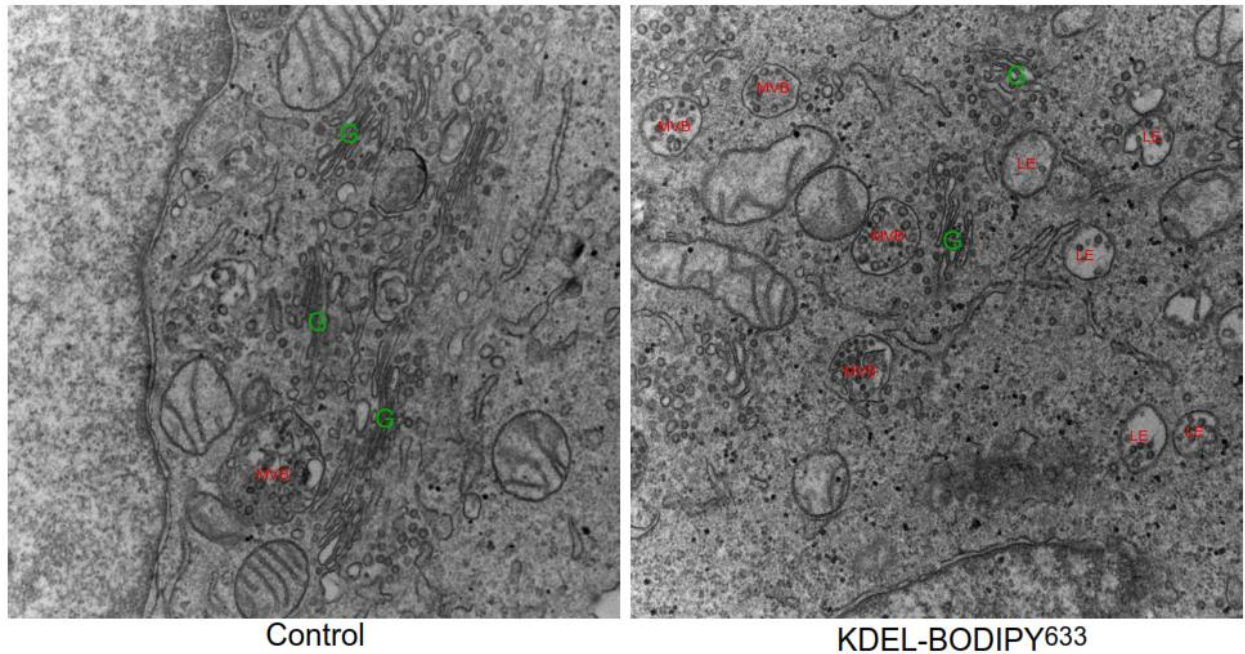


Figura 2. Efecto de la activación del R-KDEL en la localización subcelular de lisosomas y organelos relacionados.

Células HeLa fueron incubadas por 15 minutos a 37° C en presencia del péptido activador del R-KDEL; KDEL-BODIPY (1 μ M), o el péptido control KDEA-BODIPY (no activador). Luego las células fueron fijadas y sometidas a análisis por microscopía electrónica. La activación del R-KDEL promueve un aumento de lisosomas (LE, en rojo) y cuerpos multivesiculares (MVB, en rojo) en el área del AG (G, en verde).

Teniendo esta evidencia en consideración, se puede plantear que el transporte de membranas estaría coordinando el metabolismo energético y lipídico a cargo del R-KDEL, que, al tener función de GPCR, podría estar regulando mediante su señalización la biogénesis y distribución de lisosomas para este control metabólico.

2.2. Función de los lisosomas y su rol en la homeostasis celular.

Los lisosomas son organelos que contienen hidrolasas ácidas, capaces de actuar en el ambiente ácido intrínseco del lumen de los lisosomas (pH 4,6 – 5,0). Estos organelos reciben y degradan macromoléculas provenientes de las vías secretoras, endocíticas, autofágicas y fagocíticas de la célula (Luzio et al, 2007). Los lisosomas fueron una vez considerados como el punto final de la endocitosis, los cuales eran utilizados por la célula netamente para la degradación de macromoléculas. Sin embargo, actualmente se sabe que son organelos dinámicos capaces de fusionarse con una variedad de componentes celulares, además, recientemente se ha descubierto que los lisosomas cumplen un rol importante en la detección de nutrientes (Luzio et al., 2014). Los lisosomas son reconocidos actualmente también como organelos involucrados en numerosos procesos celulares y son considerados reguladores cruciales de la homeostasis celular (Appelqvist et al., 2013). Dentro de los procesos en los cuales los lisosomas están involucrados, se encuentra la secreción, señalización y metabolismo energético (Appelqvist et al., 2013; Settembre et al., 2013).

Los lisosomas poseen un rol esencial en el proceso de autofagia, ya que son los organelos encargados del paso final de degradación de los componentes celulares que entran en esa vía (Deter et al., 1967; Shen y Mizushima, 2014). El importante papel que cumplen los lisosomas en autofagia impone a estos organelos en la intersección con múltiples procesos celulares, los cuales tienen considerables implicaciones para la salud, como son las enfermedades neurodegenerativas (Nixon, 2013), enfermedades por depósito lisosomal (Ballabio, 2009; Ballabio y Gieselmann, 2009), cáncer (White, 2012; Yang et al., 2011) y enfermedades cardiovasculares (Appelqvist et al., 2013; Efeyan et al., 2012).

2.3. Autofagia y reposicionamiento de lisosomas.

La autofagia se puede describir a grandes rasgos como un proceso catabólico de auto-degradación en el cual los componentes a ser catabolizados son destinados a autofagosomas; compartimentos vesiculares que secuestran dicho material el que puede corresponder a proteínas celulares y/u organelos (Ravikumar et al., 2010; Shen y Mizushima, 2014). En células mamíferas existen 3 tipos de autofagia; macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas (CMA). Dentro de éstas, la mejor descrita hasta la fecha es la macroautofagia (referida como autofagia en este escrito), proceso que en su etapa temprana se caracteriza por la formación del fagóforo en el citoplasma de la célula; el cual corresponde a una estructura de doble membrana expandible que una vez cerrada forma a los autofagosomas. Los autofagosomas ingieren porciones del citoplasma, organelos o proteínas que serán destinadas a degradación. Actualmente, se infiere que es posible que diversas fuentes puedan estar implicadas en este proceso formación del fagóforo, entre ellas la mitocondria (Hailey et al., 2010; Hamasaki et al., 2013), el AG (Ohashi y Munro, 2010; Roy et al., 2012), el RE (Axe et al., 2008; Graef et al., 2013; Hamasaki et al., 2013), la membrana plasmática (Ravikumar et al., 2010), los endosomas de reciclaje (Puri et al., 2013, 2014), y recientemente el ERGIC (Ge et al., 2013; Ge y Schekman, 2014; He et al., 2014); sin embargo, los mecanismos que controlan la elongación del fagóforo y posteriormente la regulación del tamaño de los autofagosomas no están totalmente dilucidados (Kim et al., 2012). Posteriormente, en la etapa tardía de autofagia, también conocida como etapa de maduración o degradación, ocurre la fusión entre autofagosomas con lisosomas para formar autolisosomas, los cuales están encargados de llevar a cabo la degradación de los componentes internalizados (Ravikumar et al., 2010). El proceso completo de autofagia se define como “flujo de autofagia” (Figura 3), en el cual se identifican cada una de las estructuras que interactúan y se generan hasta llegar a la formación de los autolisosomas; donde se concreta la degradación de los componentes destinados a autofagia (Hansen y Johansen, 2011).

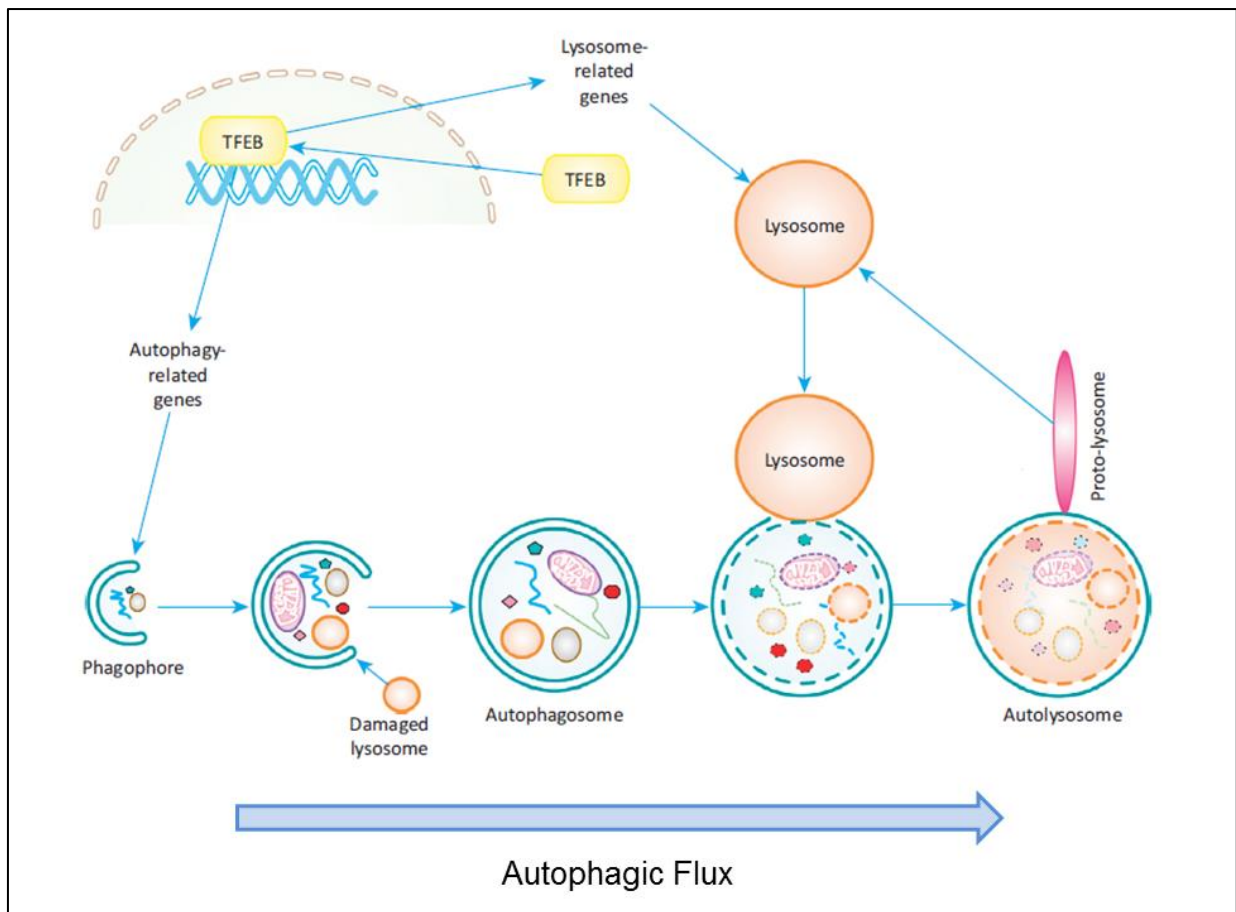


Figura 3. Esquema de flujo de autofagia.

El proceso de autofagia implica la formación de distintos compartimentos de manera organizada, como también la interacción entre organelos y la expresión de genes involucrados en el proceso, el cual se concreta con la formación de los autolisosomas; compartimentos encargados de la degradación de los componentes que ingresan a autofagia.

Modificado de Shen y Mizushima, 2014.

2.4. Complejo dineína y su importancia en el movimiento de lisosomas

Como se mencionó anteriormente, la activación del R-KDEL gatilla el reposicionamiento de lisosomas a la región perinuclear, y en base a esto es que resulta razonable considerar que la señalización mediada por el R-KDEL pudiera estar modificando la actividad de motores moleculares. Diversos organelos en la célula están constantemente en movimiento para cumplir sus funciones, y para este fin utilizan el citoesqueleto para poder desplazarse, como actina y microtúbulos. En el caso de estos últimos, el movimiento de organelos implica de su interacción con dos motores moleculares que se acoplan directamente a los microtúbulos; kinesina y dineína, complejos heteroproteicos que regulan el tráfico anterógrado y retrógrado respectivamente (Roberts et al., 2013). Los lisosomas no son excepción a este tipo de movimiento por microtúbulos, ya que se ha reportado que su desplazamiento puede ocurrir mediante su interacción con kinesina y dineína (Cabukusta & Neefjes, 2018). En base a los resultados mostrados en la Figura 2, se planteó la posibilidad de que el reposicionamiento de lisosomas al espacio perinuclear podría estar ocurriendo por tráfico retrógrado de lisosomas, posiblemente por el motor molecular dineína. Dineína posee tres unidades funcionales; cadena pesada (interacción a microtúbulos), cadena intermedia y cadena liviana (interacción con cargo). Para evaluar la posible participación de este complejo en el desplazamiento de lisosomas se realizaron experimentos de determinación de reposicionamiento de lisosomas inhibiendo la expresión de diferentes cadenas de dineína. Se encontró que el silenciamiento de la Dineína de cadena liviana roadblock tipo-1 (del inglés Dynein Light Roadblock Type-1: DynLRB1) utilizando short hairpin RNA (shRNA) (Tapia et al. 2018 Nat. Commun., en prensa) bloquea el reposicionamiento de lisosomas a la región perinuclear, aun cuando se activa el R-KDEL. Acorde con estos resultados, se determinó que este bloqueo de reposicionamiento ocurre con la inhibición de la ruta Gs del R-KDEL, no así con Gq, indicando que la señalización Gs es la responsable del fenómeno. Considerando que Gs activa a PKA se planteó la posibilidad de que la ruta del R-KDEL podría estar regulando la actividad de DynLRB1 mediante fosforilación. Por lo tanto, se realizó una búsqueda de sitios de fosforilación putativos de DynLRB1 por PKA. Se hallaron dos candidatos de sitios de fosforilación, pero se optó por la Serina 73 (S73) debido a que poseía un mejor puntaje en la búsqueda. Esta información fue utilizada para realizar

mutagénesis sitio dirigida con el fin de generar una variable fosfoinerte (no fosforilable, S73A) y variables fosfomiméticas (pseudo fosforilación en Ser o Thr, S73D & S73E) de DynLRB1. Se encontró que las versiones fosfomiméticas reposicionan a los lisosomas que se encuentran dispersos a la región perinuclear, incluso sin activar al R-KDEL con BODIPY-KDEL, efecto que fue totalmente inhibido con la versión fosfoinerte de DynLRB1, indicando que la fosforilación de la S73 de DynLRB1 es esencial para este proceso.

Tal como fue mencionado previamente, un paso importante en el flujo de autofagia corresponde a la fusión de autofagosomas con lisosomas, el cual ocurre predominantemente en la región perinuclear de la célula, indicando fuertemente la posibilidad de que este reposicionamiento de lisosomas regulado por la señalización del R-KDEL podría ser para favorecer la formación de autolisosomas.

2.5. Vía de señalización del R-KDEL como regulador de autofagia y función lisosomal

La fuente de membrana para la formación de autofagosomas no está definida completamente, si no que más bien, se ha planteado que diversos organelos son contribuyentes en la biogénesis del fagóforo y por ende la formación de autofagosomas. Esto ya ha sido demostrado, mediante la evaluación bioquímica del estado de lipidación de LC3 con fosfatidiletalona cuando esta proteína es dispuesta en diferentes organelos (Ge y Schekman 2014). Se obtuvo que el ERGIC presentó la mayor actividad de lipidación de LC3 a diferencia del resto de los organelos analizados, como Peroxisomas, Lisosomas y AG. Se concluye que el ERGIC corresponde a la principal fuente de membrana para favorecer la lipidación de LC3, y se propone que el ERGIC está actuando como una plataforma de membrana para la formación y maduración de autofagosomas (Ge y Schekman 2014). El ERGIC es un compartimiento de reciclaje ubicado entre el RE y el cis-Golgi caracterizado por estar sujeto a constante flujo de tráfico de membrana, y considerando el rol de transporte de cargo en vesículas membranosas del R-KDEL, es que corresponde a un regulador importante en la determinación del tamaño del ERGIC (Cancino et al., 2014).

Por otra parte, es importante destacar que evidencias emergentes indican que membranas provenientes de endosomas, membrana plasmática y vesículas

involucradas en el tráfico desde el AG contribuyen a la expansión del fagóforo, indicando un importante vínculo en el tráfico de vesículas y la regulación de autofagia (Lamb et al., 2013). El tráfico intracelular de membrana y la autofagia comparten diversas características en sus procesos, como la gemación y fusión de membranas y el transporte de vesículas por microtúbulos. Debido a que ambos tipos de sistemas de transporte requieren de los mismos módulos funcionales, las vías de señalización de tráfico de membrana pueden ser reguladas por autofagia y vice-versa. Diversas proteínas encargadas de regular el transporte intracelular pueden regular autofagia, como es el caso de las subunidades del coatómero COPI (α -, β - y ϵ -COP), el cual es responsable del transporte desde el AG al RE, y a la vez es esencial en autofagia, ya que se ha descrito que la depleción de β' -, β - o α -COP resulta en la acumulación de autofagosomas (Stolz et al., 2014). La activación del R-KDEL produce un aumento en el nivel de fosforilación y además en la dinámica del complejo COPI (Cancino et al., 2014). Adicionalmente, la activación prolongada del R-KDEL gatilla una respuesta de regulación de genes (Cancino et al., 2014) en la que un número considerable de genes de ERGIC (23 de 24) y genes involucrados en la función y biogénesis lisosomal (58 de 66) son regulados positivamente. Entre ellos genes de la ATPasa tipo V, cuyo rol es crucial para la mantención del pH ácido de los lisosomas, homeostasis celular y modulación de la autofagia mediante el control de la vía mTOR/TFEB en respuesta a la acumulación de aminoácidos (Roczniak-Ferguson et al., 2012; Settembre et al., 2012; Zoncu et al., 2011).

Recolectando todas las evidencias previamente expuestas, se puede inferir un vínculo funcional entre el tráfico intracelular y el sistema de degradación a cargo de autofagosomas/lisosomas. Considerando que el R-KDEL es un importante intermediario para la regulación de la homeostasis celular mediante su vía de señalización gatillada por tráfico intracelular, es que resulta un blanco interesante a estudiar para describir cuál es su implicancia en las respuestas celulares asociadas al control de homeostasis, y en este estudio en particular, su vinculación con autofagia.

3. HIPÓTESIS

El AG tiene la capacidad de regular la homeostasis celular mediante la regulación de la composición bioquímica de la mayoría de los organelos. R-KDEL por su parte, tiene un rol importante en la mantención de la homeostasis del AG mediante sus vías de señalización que censan el flujo de tráfico entre RE y AG, lo cual se ve reflejado en la función de regulación de transporte (Cancino et al., 2014; Pulvirenti et al., 2008). Dentro de las nuevas funciones que podría estar regulando la vía de señalización mediada por el R-KDEL se encuentra la función lisosomal y autofagia (Cancino et al., 2014). La regulación de función lisosomal por el R-KDEL no es solamente transcripcional, y el reposicionamiento de lisosomas al espacio perinuclear por activaciones cortas del receptor revelaron la implicancia del motor molecular DynLRB1 para este movimiento (Tapia et al., 2018, Nat. Commun. en prensa). En base a estos hallazgos, y considerando la habilidad de regulación de homeostasis dada por el AG en conjunto con la función de detección de nutrientes otorgada por los lisosomas y su fundamental rol en autofagia, se tiene una posible comunicación inter-organelos en la que a través de la señalización del R-KDEL se podría estar regulando la homeostasis celular de forma coordinada.

A partir de lo anterior, se planteó la siguiente hipótesis:

“La activación de las rutas de señalización Gs y Gq ría abajo del R-KDEL promueven la activación de autofagia y fusión de autofagosomas con lisosomas mediante la regulación del motor DynLRB1.”

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general:

Establecer el rol de las rutas de señalización Gs y Gq del R-KDEL en la activación del flujo autofágico y formación de autolisosomas, evaluando la implicancia del motor molecular DynLRB1.

4.2. Objetivos específicos:

1. Determinar si la activación de las rutas de señalización Gs y Gq del R-KDEL activan el flujo de autofagia.
2. Examinar si las rutas Gs y Gq del R-KDEL participan en el proceso de fusión de autofagosomas con lisosomas.
3. Evaluar el impacto del reposicionamiento de lisosomas al área perinuclear por la fosforilación de DynLRB1 en Serina 73 en la fusión de autofagosomas con lisosomas.

5. METODOLOGÍA

5.1. Estrategia general y herramientas.

Los experimentos desarrollados en esta tesis se basaron en la modulación (activación/inhibición) de las vías de señalización del R-KDEL específicamente de las rutas Gs & Gq para luego describir los efectos de dicha modulación en el proceso de autofagia en modelos celulares humanos. También, se evaluó el rol de la fosforilación de DynLRB1 en la Serina 73 en el desplazamiento de lisosomas y como dicha relocalización estaría favoreciendo la fusión de autofagosomas con lisosomas.

5.1.1. Péptidos membrana-permeable.

El péptido membrana-permeable activador del R-KDEL (BODIPY-KDEL) se utilizó para activar al R-KDEL y sus vías de señalización río abajo. El efecto de este péptido permeable ha sido validado en estudios anteriores (Cancino et al., 2014 y Giannotta et al., 2012). Además, se utilizaron los péptidos inhibitorios, previamente validados, para las proteínas Gs & Gq de la ruta del R-KDEL:

- R8-Gs (RRRRRRRR-RVFNDICRDIQRMHLRQYELL) (Cancino et al., 2014)
- R8-Gq (RRRRRRRR-LQLNLKEYNAV) (Cancino et al., 2014)

5.1.2. Marcador de autofagia LC3.

Uno de los eventos característicos que ocurren por la activación de autofagia es la lipidación de la proteína asociada a microtúbulos 1 de cadena liviana 3 (LC3). Esta proteína presenta dos formas; una sin lípido asociado (LC3-I) y otra conjugada con el fosfolípido fosfatidiletanolamina (LC3-II) (Tanida et al., 2008). La forma LC3-I se encuentra de manera ubicua en el citoplasma de la célula, mientras que la forma LC3-II se asocia a la membrana de los autofagosomas (Kabeya et al., 2000), cumpliendo un rol importante en la formación de la membrana aislada de los autofagosomas (Cherra et al., 2010).

La evaluación de formación de autofagosomas y/o autolisosomas mediante el uso de esta proteína cuando está conjugada a fluoróforos (por ejemplo: mCherry-GFP-LC3) es una de las maneras más convencionales para la detección de la activación de autofagia (Hansen y Johansen, 2011) y el seguimiento del flujo autofágico.

En esta tesis, se utilizó la proteína LC3-mCherry-GFP, y con esta herramienta, la activación de la autofagia pudo ser visualizada por la biogénesis de autofagosomas, los cuales se detectan por microscopía de fluorescencia como estructuras fluorescentes que presentan la emisión de ambos fluoróforos. El siguiente paso en el flujo de autofagia es la fusión entre autofagosomas y lisosomas, la cual conlleva a la formación de autolisosomas (Shen y Mizushima, 2014). Los autolisosomas tienen un pH ácido similar al de los lisosomas (pH 4,5-5,0), el cual permite la condición óptima para la acción de las enzimas hidrolíticas requeridas para la degradación de los componentes llevados a autofagia (Shen y Mizushima, 2014). El pH ácido como el de estos compartimentos produce la pérdida de fluorescencia de GFP, ya que solamente es estable en un rango de pH de 6 a 10 (Campbell y Choy, 2001), sin afectar la emisión de mCherry, que es insensible al cambio de pH. Los autolisosomas tienen la función de degradar los componentes que han sido secuestrados, esto incluye al marcador LC3, por lo tanto, cuando se tienen autolisosomas consolidados, la fluorescencia de ambos fluoróforos asociados a este marcador se pierde (Figura 4).

5.1.3. Modelos celulares.

Para los experimentos de objetivos 1 y 2, se utilizó la línea celular H4 de neuroglioma humano que expresa establemente LC3-mCherry-GFP (referidas en este escrito como: H4-LC3-mCherry-GFP). Estas células fueron mantenidas con medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% y Penicilina (Pen)/Estreptomicina (Str) [50 µL/mL], geneticina [50 µg/mL], a 37°C en un ambiente con 5% de CO₂ y 95% de humedad.

Para el objetivo final y experimentos de transfección, se utilizaron células HeLa, las que fueron mantenidas con el medio de cultivo DMEM + 10% FBS y Pen/Str, a 37° con 5% CO₂ y 95% de humedad.

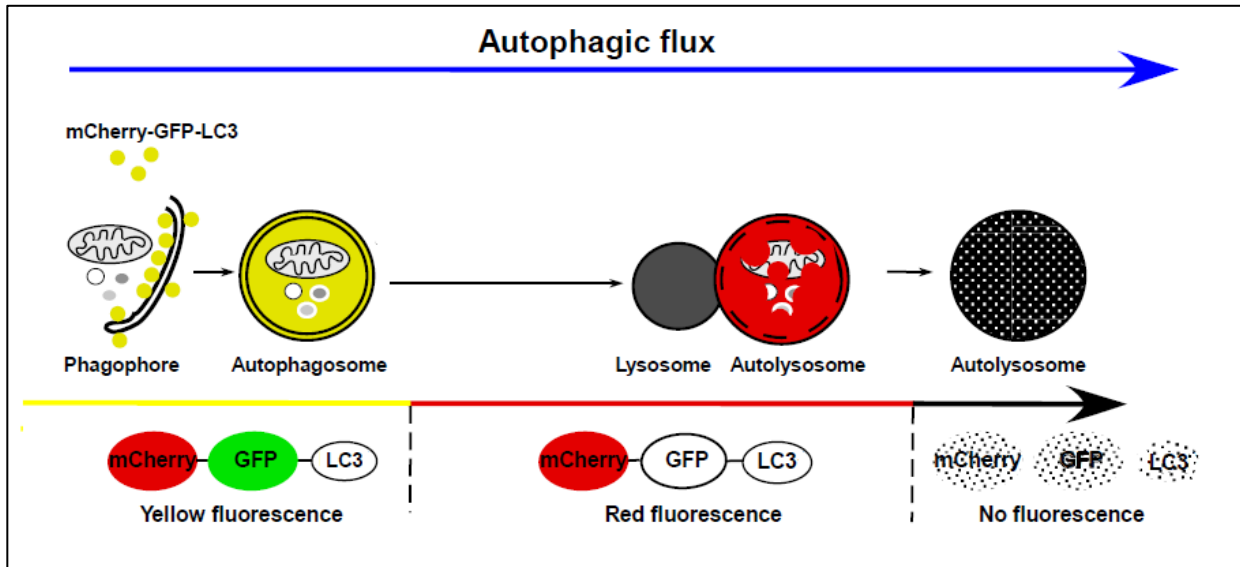


Figura 4. Diagrama de flujo de autofagia a nivel de emisión de fluorescencia en diferentes estructuras con marcador LC3 conjugado con mCherry y GFP.

Inicialmente, la fluorescencia de ambos fluoróforos se manifiesta de forma normal cuando el marcador se encuentra en el citoplasma, unido al fagóforo, o a la membrana de los autofagosomas. Cuando LC3 se ha unido a los autofagosomas y ocurre la formación de los autolisosomas, el pH de éstos últimos impide la emisión de la fluorescencia verde de GFP, por lo que sólo se capta fluorescencia roja en estos compartimentos. Finalmente, la actividad de degradación del autolisosoma gatilla la eliminación del marcador LC3 y sus fluoróforos, por lo que se pierde toda emisión.

Modificado de Tom E. Hansen y Terje Johansen, 2011.

5.1.4. Estado nutritivo.

El estado nutritivo es un factor importante para determinar el estado de autofagia de la célula, por lo tanto, este parámetro fue abordado en el diseño de los experimentos que se realizaron en esta tesis. Para los experimentos de evaluación de activación de autofagia por el R-KDEL, se ocuparon células en estado nutritivo óptimo, y para los experimentos de evaluación de fusión de autofagosomas con lisosomas se utilizaron células dispuestas previamente a inanición para inducir la formación de autofagosomas, ya sea manteniendo a las células 48 horas sin recambio de medio de cultivo, o por uso de Hank's Balanced Salt Solution (HBSS); solución sin nutrientes que induce autofagia, la cual fue utilizada como tratamiento por 1 hora para inducir la formación de autofagosomas.

5.1.5. Microscopía de fluorescencia.

El efecto de la alteración de las vías de señalización dependiente del R-KDEL en autofagia fue evaluado mediante microscopía de fluorescencia para llevar a cabo el seguimiento del número y emisión de fluorescencia de las estructuras que posean el marcador LC3-mCherry-GFP en células H4. Se analizó número de autofagosomas (que poseen emisión GFP y mCherry) y de autolisosomas (que sólo poseen emisión mCherry). Para esto se utilizó un microscopio de epifluorescencia Leica DMI6000 y confocal espectral Leica DMI8. Ambos equipado con control de temperatura y filtros de fluorescencia adecuados de excitación (350, 450, 490, 550 y 630 nm).

5.1.6. Transfección de DynLRB1-HA & LC3-mCherry-GFP con TransIT-LT1

Como se mencionó previamente, los lisosomas se desplazan a través de microtúbulos de forma retrógrada a la región perinuclear por dineína, específicamente, por la fosforilación de la Serina 73 de DynLRB1 debido a la activación de la PKA en la ruta de señalización del R-KDEL. Por lo tanto, para evaluar el impacto de la fosforilación de DynLRB1 en la relocalización y fusión con autofagosomas, se transfectaron células HeLa-WT con diferentes plásmidos pCMV1 (Colaboración con Dra. Gloria Arriagada, Universidad Andrés Bello) que contienen las secuencias de diferentes versiones de DynLRB1. La forma nativa de DynLRB1-HA será denominada como DynLRB1-WT, la forma fosfoinerte DynLRB1-S73A (Serina 73 reemplazada por Alanina) y, por último, las

versiones fosfomiméticas de DynLRB1-S73D (Serina 73 reemplazada por Aspártico) & DynLRB1-S73E (Serina 73 reemplazada por Ácido Glutámico). Debido a que estas células carecen del marcador de autofagia, también fueron transfectadas con el DNA que codifica para LC3-mCherry-GFP. Las células fueron sembradas en una placa de 1.9 cm², manteniéndolas con DMEM 10% FBS hasta dejarlas en 80% de confluencia, esto se hizo siguiendo el protocolo del agente de transfección TransIT-LT1. Una vez llegadas a confluencia, las células fueron transfectadas utilizando la mezcla de transfección que consiste en medio de cultivo sin suero (Opti-MEM), el agente de transfección TransIT-LT1 y 0,5 µg de cada DNA a utilizar para la co-transfección, lo cual se muestra en la Tabla 1.

	DynLRB1 nativa	DynLRB1 Fosfoinerte	DynLRB1 Fosfomimética	DynLRB1 Fosfomimética
DNA1	DynLRB1-WT	DynLRB1-S73A	DynLRB1-S73D	DynLRB1-S73E
DNA2	LC3-mCherry-GFP	LC3-mCherry-GFP	LC3-mCherry-GFP	LC3-mCherry-GFP

Tabla 1. Co-transfección de LC3-mCherry-GFP con mutantes de DynLRB1.

Diferentes mezclas de DNAs fueron utilizadas para expresar las diferentes mutantes de DynLRB1 en conjunto con el marcador de autofagia LC3-mCherry-GFP.

5.2. Diseño experimental para rol de la señalización del R-KDEL en la activación de autofagia en condiciones nutritivas óptimas.

El propósito de este diseño experimental es evaluar si la activación del R-KDEL es suficiente para inducir autofagia, aun cuando las células disponen de nutrientes, para así descartar a la inanición como inductor de autofagia en estos experimentos.

5.2.1. Condicionamiento de estado nutritivo óptimo.

Células H4-mCherry-GFP fueron condicionadas a estado nutritivo óptimo durante 2 horas con medio DMEM-10%FBS-Pen/Str [50 µL/mL]) a 37°C 5% de CO₂ previo a comenzar el experimento, para así otorgar nuevos nutrientes a las células.

5.2.2. Tratamiento con activadores e inhibidores.

Para realizar el tratamiento a las células ya condicionadas se utilizaron soluciones de los activadores e inhibidores disueltos en medio de cultivo (con la misma composición mencionada hasta ahora). El tratamiento fue a 37°C por un tiempo total de 30 minutos. Se utilizó un control sin tratamiento para realizar una descripción del proceso normal del flujo de autofagia. Para evaluar el rol de la ruta de señalización del R-KDEL se tuvieron diferentes condiciones; para determinar el rol de la activación del R-KDEL, se utilizó una solución del péptido BODIPY-KDEL [1 µM]. Para determinar el rol de las rutas Gs & Gq, se utilizó la combinación del péptido activador BODIPY-KDEL [1 µM] en adición del péptido inhibitorio de la proteína Gs R8-Gs [10 µM] ó R8-Gq [10 µM].

5.2.3. Visualización de efecto de modulación de señalización del R-KDEL en activación de autofagia.

La activación del flujo de autofagia fue determinada mediante la detección de formación de autofagosomas, ya que corresponde al primer paso identificable de la activación de autofagia con el marcador LC3-mCherry-GFP. Debido a que este marcador se une a la membrana de los autofagosomas, la detección de aparición de autofagosomas se confirma con la presencia de fluorescencia verde (GFP, excitación 490 nm) y roja (mCherry, excitación 550 nm) colocalizadas en compartimentos fluorescentes visibles por microscopía de fluorescencia, mientras que los autolisosomas se detectaron por su emisión exclusivamente roja. Se realizó un recuento de estas estructuras y además se hicieron capturas a distintos tiempos de las células tratadas con los activadores e inhibidores, y sin tratamiento para tener un seguimiento del flujo de autofagia por un periodo total de 30 minutos.

5.3. Diseño experimental para evaluación de fusión de autofagosomas con lisosomas mediado por R-KDEL.

Para estos experimentos, se utilizó el mismo diseño experimental explicado previamente (Metodología 5.2), a excepción del paso de condicionamiento de estado nutritivo (Metodología 5.2.1). Debido a que el fundamento de este experimento consiste en evaluar el rol del R-KDEL en la fusión de autofagosomas con lisosomas, fue necesario tener células con autofagosomas. Por lo tanto, las células fueron sometidas

a inanición manteniendo su medio de cultivo por 48 horas sin renovación, para así favorecer el agotamiento de nutrientes en el medio e inducir la formación de autofagosomas.

La formación de autolisosomas se determinó a partir de la pérdida de fluorescencia verde en los compartimentos que presentan el marcador LC3. Por lo tanto, dichos compartimentos que emitan exclusivamente fluorescencia roja corresponden autolisosomas. Se utilizó un control sin tratamiento de péptidos para describir y comparar el desarrollo del flujo de autofagia regular con respecto a las condiciones experimentales.

5.4. Diseño experimental evaluación de fosforilación de DynLRB1.

Debido a que este experimento busca evaluar la fusión de autofagosomas con lisosomas, se requiere de autofagosomas preexistentes en las células co-transfectadas con DynLRB1 & LC3-mCherry-GFP, para este fin, las células fueron sometidas a inanición realizando un reemplazo del medio de cultivo por HBSS, la cual fue utilizada como tratamiento por 1 hora para inducir la formación de autofagosomas. Luego del condicionamiento nutritivo, las células fueron tratadas con el péptido BODIPY-KDEL, para activar el R-KDEL.

Posteriormente, las capturas obtenidas en los experimentos realizados fueron analizadas con el programa ImageJ. Para realizar la cuantificación de autofagosomas y autolisosomas, se seleccionó el área de cada célula a analizar mediante la determinación de una región de interés (ROI). Con esta selección, se utilizó el plugin TrackMate de ImageJ, el cual utiliza un criterio de tamaño e intensidad de estructuras fluorescentes para hacer un recuento automático de dichas estructuras. Por otra parte, para confirmar la identificación de autofagosomas y autolisosomas se utilizó el algoritmo de linescan, el cual sirve para analizar picos (peaks) de fluorescencia de un segmento de interés en forma linear en la imagen, describiendo de esta forma la colocación de pixeles de emisión verde (autofagosomas) y roja (autolisosomas).

6. RESULTADOS

6.1.1. Activación de ruta de señalización del R-KDEL promueve el flujo autofágico.

Para determinar el efecto de la activación del R-KDEL en la activación de autofagia, se utilizaron células H4-LC3-mCherry-GFP que expresan el marcador de autofagia de doble emisión, GFP-sensible y mCherry-insensible al pH ácido del lisosoma. Estas células fueron incubadas con el péptido permeable BODIPY-KDEL por un periodo de 30 minutos, sin depleción de nutrientes. Se cuantificó el número de autofagosomas (positivos para GFP y mCherry) y se comparó con un control sin tratamiento en presencia de nutrientes. Para este criterio se consideró el número de estructuras LC3 positivas en cada célula. Debido a que las células presentan constitutivamente autofagia basal, solamente se consideraron como “células autofágicas” aquellas que poseían un número de autofagosomas (positivos para GFP y mCherry) y autolisosomas (positivos sólo para mCherry) mayor a 5 por célula. Este criterio surge del seguimiento del número de estructuras autofágicas (autofagosomas y autolisosomas) en células H4-LC3-mCherry-GFP por 2 horas en medio de cultivo normal (DMEM 10% FBS), donde el promedio de estructuras autofágicas por célula fue menor a 5.

El número de células autofágicas se expresó luego como porcentaje del total de células analizadas por cada condición. La figura 5 muestra que la activación del R-KDEL con BODIPY-KDEL por un periodo de 15 minutos es suficiente para producir un aumento en el número de células autofágicas, lo cual se mantiene a los 30 min y que corresponde a un 42% de células autofágicas respecto al control sin tratamiento. El bloqueo tanto de las rutas Gs como Gq inhibió casi completamente el aumento de células autofágicas, siendo similar al control sin tratamiento (Fig. 6). Esto muestra que el R-KDEL y sus vías de señalización controlan la formación de autofagosomas.

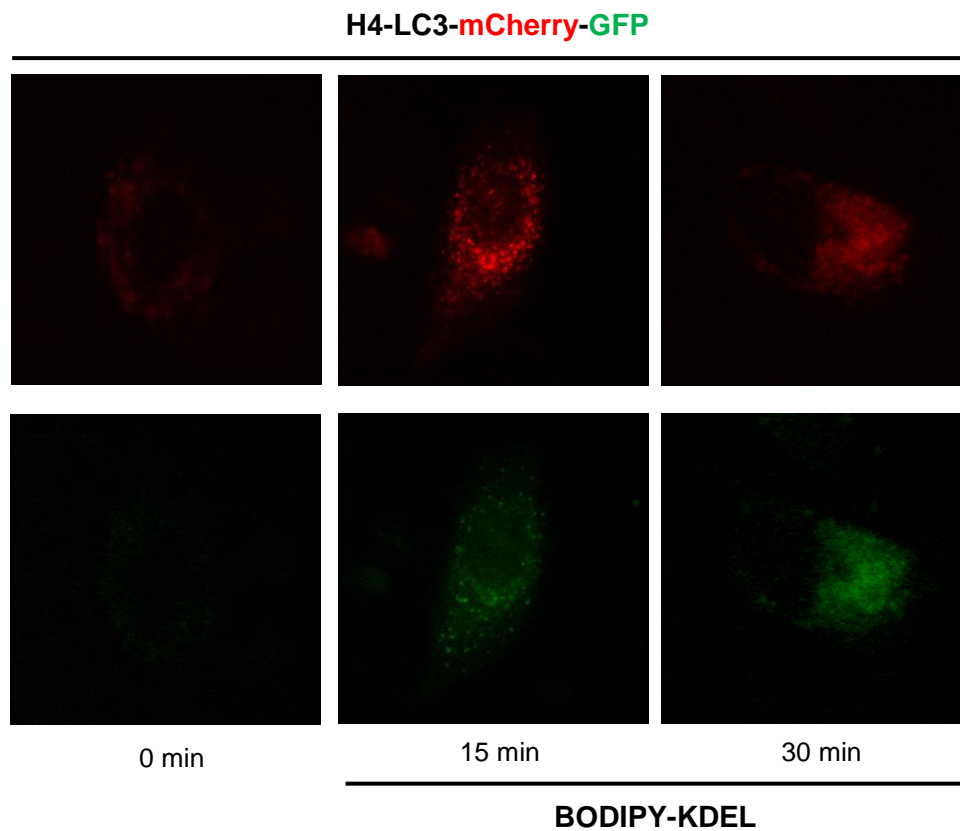


Figura 5. Inducción de autofagia por activación de vía de señalización del R-KDEL.

Células H4-LC3-mCherry-GFP fueron tratadas con el péptido membrana-permeable BODIPY-KDEL a diferentes tiempos; 15 y 30 minutos. Las células no tratadas (control T0) presentan un número bajo de autofagosomas en su mayoría, presentando un bajo porcentaje de células autofágicas.

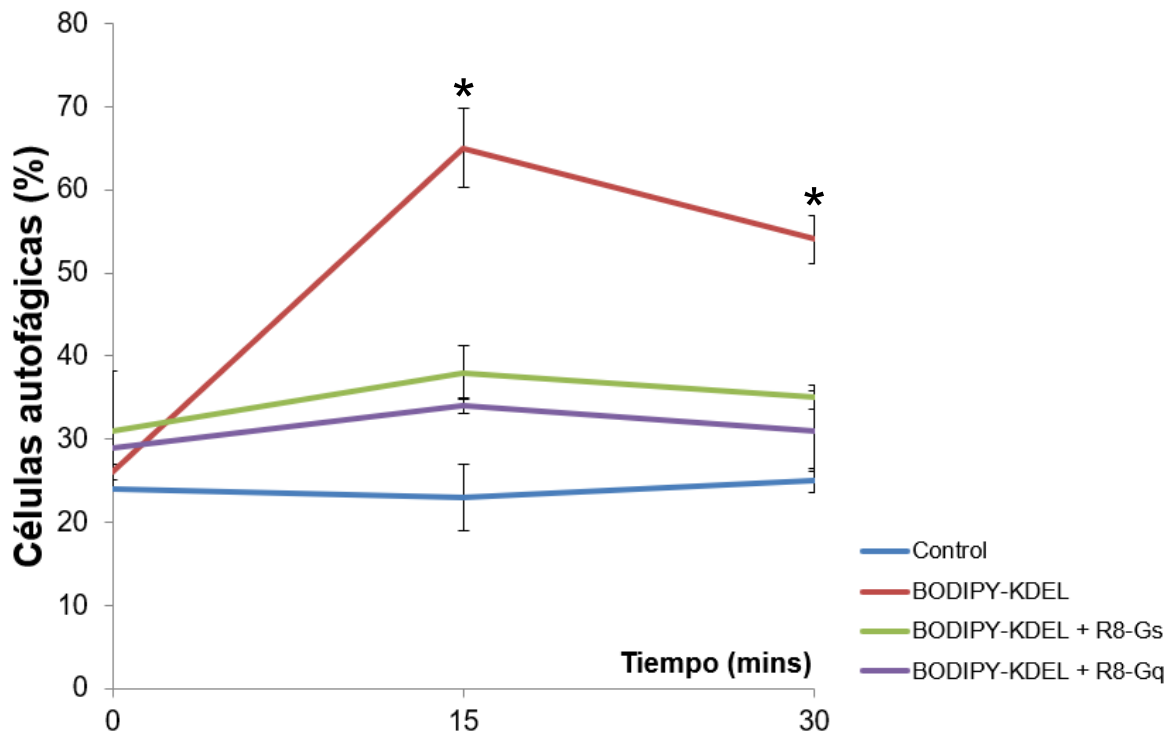


Figura 6. Cuantificación de células autofágicas por activación del R-KDEL

Células H4-LC3-mCherry-GFP fueron tratadas con el péptido membrana-permeable BODIPY-KDEL a diferentes tiempos; 15 y 30 minutos. Las células no tratadas (control T0) presentan un número bajo de autofagosomas en su mayoría, presentando un bajo porcentaje de células autofágicas. Sin embargo, se tiene un aumento considerable en el porcentaje de células autofágicas en el grupo de células con el R-KDEL activado por el péptido BODIPY-KDEL. La información se representa como \pm error estándar (n= 50 células) ($P < 0,05$ ANOVA) (*= $p < 0,05$, posterior Test de Tukey).

6.1.2. Vía de señalización del R-KDEL modula la fusión de autofagosomas con lisosomas.

Para determinar si el R-KDEL regula el flujo autofágico en las etapas posteriores a la formación de autofagosomas, se evaluó el efecto de la modulación de la vía de señalización del R-KDEL en la fusión de autofagosomas con lisosomas. Para este fin, se utilizaron células H4-LC3-mCherry-GFP privadas de nutrientes para gatillar autofagia, e inducir la formación de un número elevado de autofagosomas. Estas células fueron luego incubadas con el péptido BODIPY-KDEL para activar al R-KDEL por 15 y 30 min. El proceso de fusión de autofagosomas con lisosomas fue evaluado analizando una población de células, utilizando como criterio dos categorías de células. Se consideraron como “células con autofagosomas” aquellas que poseyeran >50% de estructuras fluorescentes correspondientes a autofagosomas y, por otra parte, se atribuyeron como “células con autolisosomas” aquellas que mostraban >50% de autolisosomas de total de estructuras fluorescentes cuantificadas. Como era de esperar, la condición control mostró un número constante de células con autofagosomas hasta los 30 min (Figura 6). Por otra parte, la condición de tratamiento con BODIPY-KDEL produjo un aumento significativo en el número de células con autolisosomas, el cual se cuantifica a aproximadamente un 40% de células con autolisosomas por la activación de R-KDEL a los 15 min en comparación al control. La inhibición de la ruta Gs o Gq bloqueó parcialmente este efecto, ya que el aumento de células con autolisosomas oscila entre 10-15%, aproximadamente, respecto al control en 15 y 30 min post-tratamiento con BODIPY-KDEL. Por lo tanto, la inducción de la fusión de autofagosomas con lisosomas por la activación del R-KDEL muestra que la ruta de señalización potencia el flujo de autofagia, y tanto la ruta Gs como Gq están teniendo un rol en el flujo de autofagia.

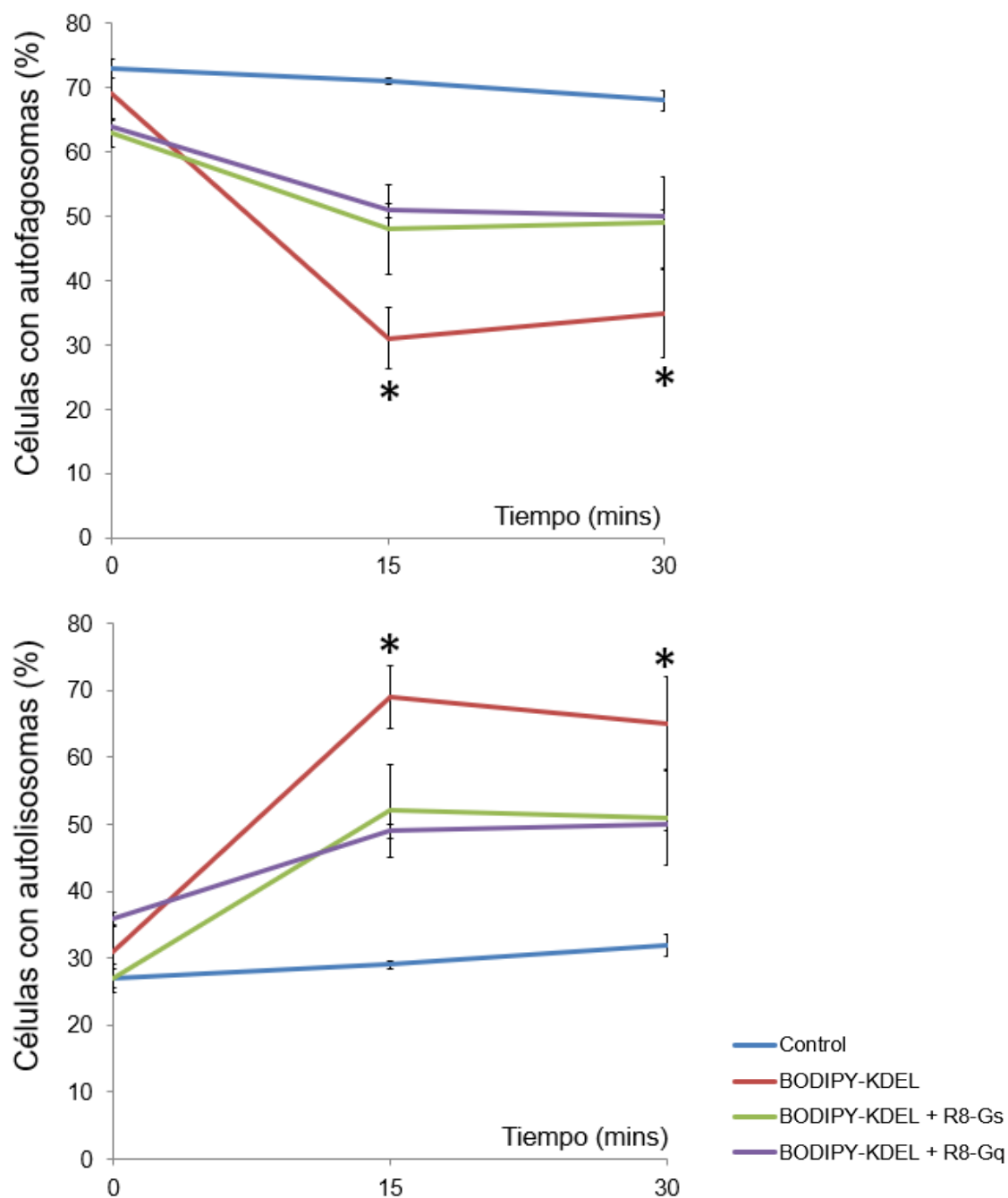


Figura 7. Fusión de autofagosomas con lisosomas por activación de R-KDEL.

Células H4-LC3-mCherry-GFP fueron sometidas a inanición y posteriormente fueron tratadas con el péptido membrana-permeable BODIPY-KDEL. “Células con autofagosomas” corresponden a células con >70% de autofagosomas en su recuento total de estructuras fluorescentes por célula. El mismo criterio se utilizó para determinar “Células con autolisosomas”, pero cuantificando autolisosomas. La información se representa como el promedio \pm error estándar (n= 50 células) (P<0,05 ANOVA) (*=p<0,05, posterior Test de Tukey).

6.1.3. Fosforilación de DynLRB1 favorece la fusión de autofagosomas con lisosomas

Con los resultados anteriores, se tiene, por lo tanto, que el R-KDEL induce la formación de autolisosomas, lo que llevó al cuestionamiento de qué proceso está regulando el R-KDEL para favorecer de tal manera al flujo autofágico, en particular la fusión de autofagosomas con lisosomas. Como se mencionó anteriormente, resultados no publicados del laboratorio demuestran que el motor de dineína, DynLRB1 es responsable de controlar el reposicionamiento de lisosomas hacia la zona perinuclear durante la activación del R-KDEL y se ha descrito que este evento favorece la fusión de lisosomas con autofagosomas para dar paso a la formación de autolisosomas (Li et al., 2016; Korolchuk y Rubinsztein, 2011). Por lo tanto, se planteó la posibilidad de que DynLRB1 podría estar involucrado en el control del posicionamiento de lisosomas para favorecer su fusión con los autofagosomas bajo el control del R-KDEL por la ruta Gs-PKA. Para probar dicha hipótesis, se co-transfectaron células HeLa-WT con los plásmidos de las diferentes versiones de DynLRB1 en conjunto con el marcador de autofagia LC3-mCherry-GFP (Tabla 1). Posterior a la transfección, las células fueron privadas de nutrientes utilizando HBSS 1X por 1 hora con el fin de inducir la formación de autofagosomas. Se consideró como condición control las células que expresan la forma nativa de DynLRB1 (DynLRB1-WT) con LC3-mCherry-GFP. Estas células al ser tratadas con el péptido BODIPY-KDEL muestran una clara formación de autolisosomas, lo que indica un potenciamiento de la fusión de autofagosomas con lisosomas cuando se activa el R-KDEL (Figura 8). Sin embargo, al evaluar el efecto de la expresión de la variable fosfoinerte de DynLRB1 (S73A), se obtuvo que no se favorece la formación de autolisosomas, aun activando el R-KDEL con el péptido BODIPY-KDEL durante 30 minutos (Figura 9). Por el contrario, y de forma interesante, las versiones fosfomiméticas de DynLRB1 (S73D, S73E), muestran un fenotipo claro de presencia de autolisosomas, incluso sin ser tratadas con BODIPY-KDEL, lo que indica que la forma fosforilada de DynLRB1 en su Serina 73, es suficiente para favorecer el evento de fusión de autofagosomas con lisosomas (Figura 9).

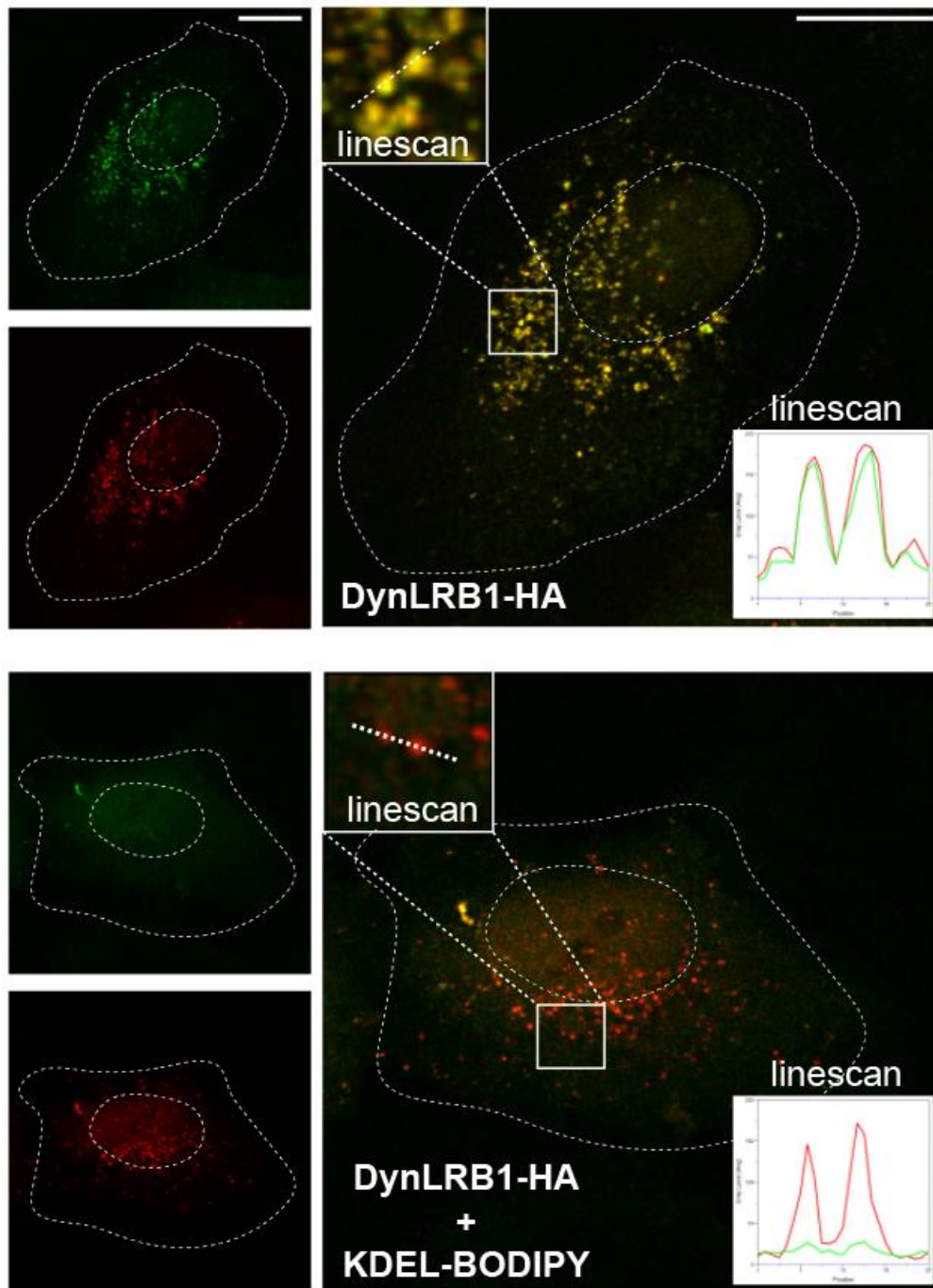


Figura 8. Activación de R-KDEL induce la fusión de autofagosomas y lisosomas. Células HeLa expresando LC3-mCherry-GFP y DynLRB1. Imagen superior corresponde a control e inferior al tratamiento durante 30 minutos con el péptido BODIPY-KDEL. La activación del R-KDEL induce la fusión de autofagosomas con lisosomas (imagen inferior). Análisis de linescan (hecho en las regiones circulares segmentadas de mayor grosor) se llevó a cabo para confirmar la identificación de autofagosomas o autolisosomas. La barra superior corresponde a 10 μ M.

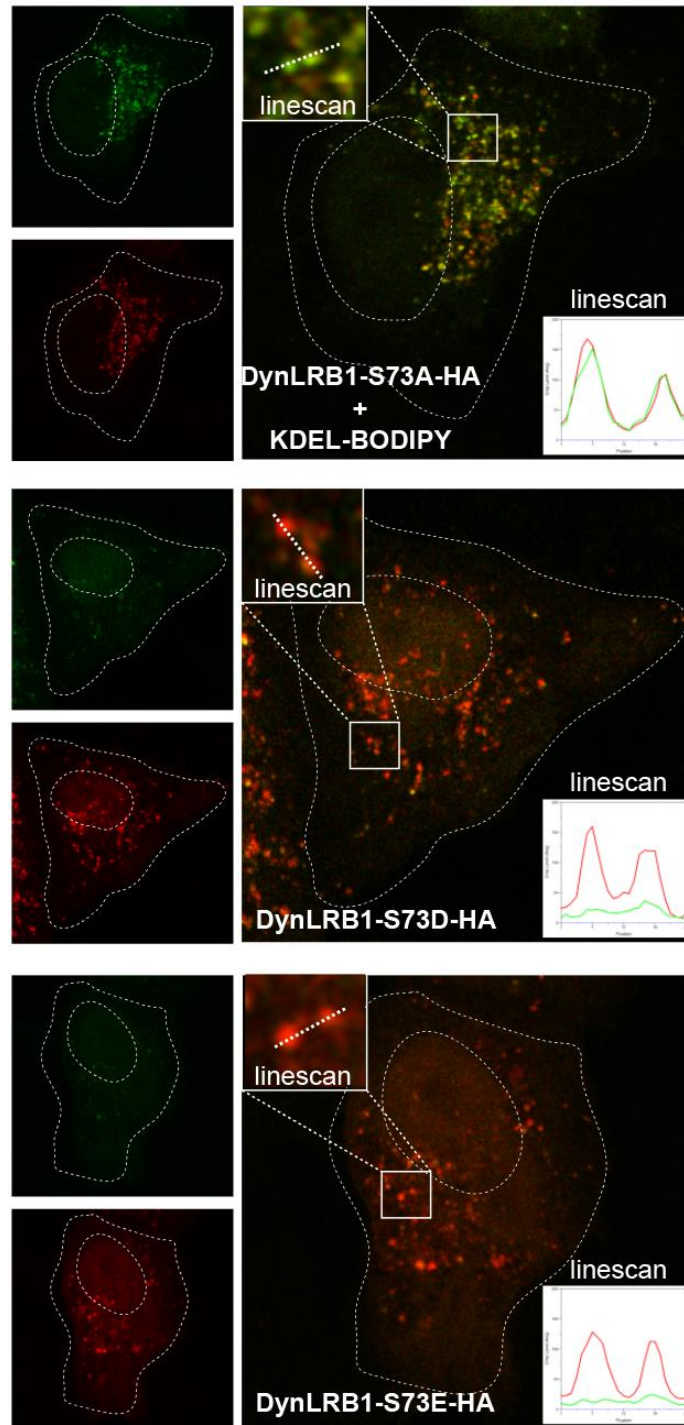


Figura 9. Fosforilación de DynLRB1 favorece la formación de autolisosomas.

Células HeLa expresando LC3-mCherry-GFP y las tres diferentes versiones mutantes de DynLRB1: S73A/S73D/S73E. Las células transfectadas con las versiones fosfomiméticas de DynLRB1 muestran una presencia predominante de autolisosomas, aún sin activación del R-KDEL, efecto no visible en células con la forma fosfoinerte (S73A), a pesar de ser tratadas con BODIPY-KDEL por 30 mins.

Para confirmar la identificación de autofagosomas y autolisosomas, las capturas fueron analizadas por ImageJ, utilizando el algoritmo de linescan, el cual permite analizar peaks de fluorescencia de forma lineal en un segmento específico de la imagen, describiendo así de forma cuantitativa la colocación de pixeles de emisión verde (autofagosomas) y emisión roja (autolisosomas) (Figura 8). El círculo segmentado blanco pequeño en las capturas denotan los peaks de fluorescencias analizados por linescan, los cuales confirman la identificación adecuada de autofagosomas y autolisosomas. Las mismas capturas de los experimentos fueron utilizadas para llevar a cabo la cuantificación de autofagosomas y autolisosomas, para esto se ocupó el plugin TrackMate de Image J, el cual utiliza un criterio de tamaño e intensidad de estructuras fluorescentes para hacer un recuento automático de dichas estructuras. Con este dato cuantitativo, se obtuvo posteriormente la proporción de autolisosomas respecto a autofagosomas en las diferentes condiciones. Esta cuantificación da cuenta de que la forma activa del motor DynLRB1, ya sea por la activación del R-KDEL, o por la simple expresión de las versiones fosfomiméticas de DynLRB1 (S73D & S73E), presentan una proporción promedio de autolisosomas respecto a autofagosomas de 12:1 aproximadamente (Figura 10). Un resultado opuesto se obtuvo con la expresión de la variable fosfoinerte de DynLRB1 (S73A), ya que la cuantificación de autolisosomas-autofagosomas arroja una proporción de 2:1, resultado similar al control sin activación del R-KDEL (Figura 10). Estos resultados muestran que la versión activa de DynLRB1 asociada a la activación de la vía de señalización del R-KDEL es esencial para la fusión de autofagosomas con lisosomas en la región perinuclear de la célula.

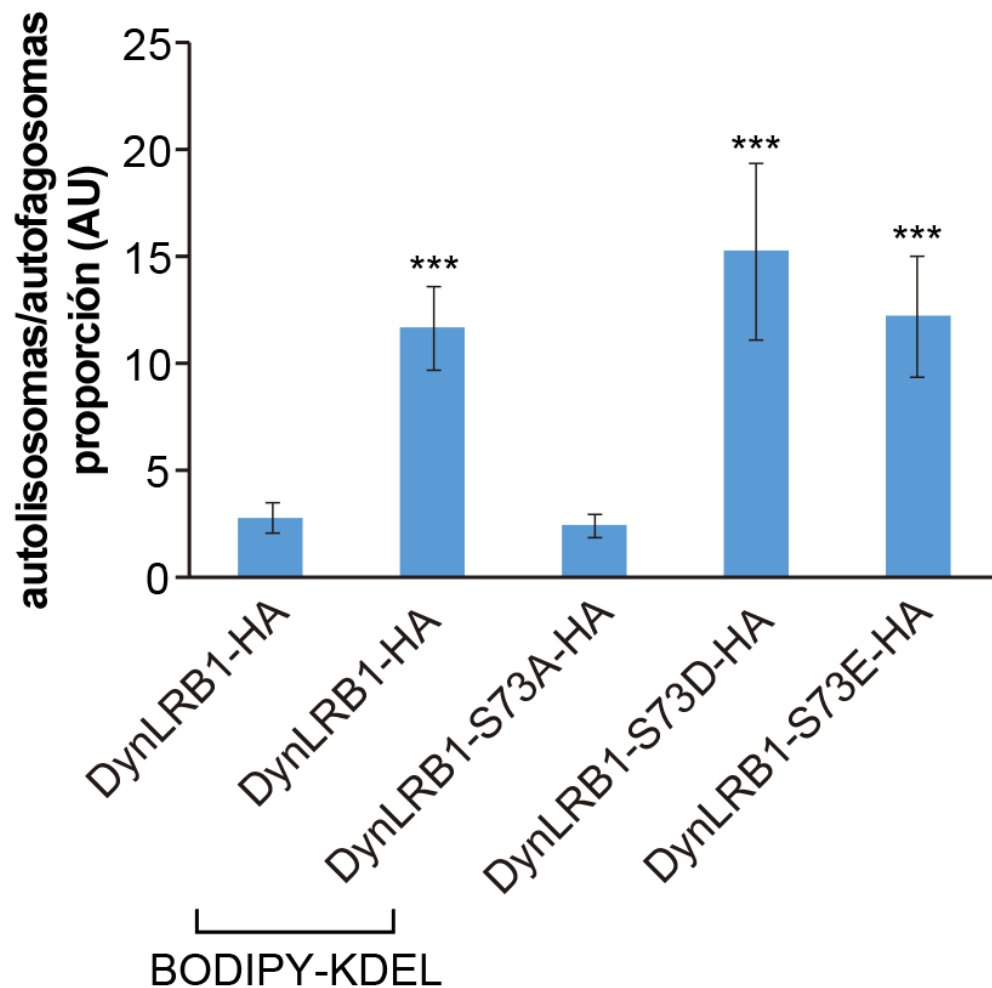


Figura 10. Cuantificación de autolisosomas & autofagosomas en células expresando LC3-mCherry-GFP y diferentes versiones de DynLRB1.

Capturas de experimentos de evaluación de rol de DynLRB1 en la fusión de autofagosomas con lisosomas fueron utilizadas para cuantificación del número de autofagosomas y autolisosomas. La información se representa como el promedio \pm error estándar (n= 50 células) *p<0,05, *** p <0,001 (T-student).

7. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta tesis dan cuenta de que existe una estrecha relación entre la señalización del R-KDEL en el AG y la activación y potenciamiento del flujo autofágico, demostrando que esta ruta de señalización participa efectivamente en el proceso de autofagia. Es llamativo que la estimulación de autofagia mediada por la activación del R-KDEL ocurra aún en presencia de nutrientes, ya que indica que este mecanismo de activación de autofagia dado no requiere de una señal de inanición. Esto podría estar indicando que el simple proceso de tráfico vesicular entre el RE y el AG es un importante regulador positivo de autofagia, o más bien, que la autofagia sea necesaria para que se mantenga el tráfico vesicular. Tapia et al., han demostrado efectivamente que la inhibición de la autofagia mediante el silenciamiento de ATG5, proteína esencial en la formación de autofagosomas (Condogno y Meijer, 2006), bloquea el tráfico desde el RE hacia el AG (Tapia et al., 20018, Nat Commun., en prensa). Estos antecedentes, en conjunto con lo obtenido en esta tesis, indica que existe una regulación de la autofagia dada por el tráfico vesicular, sin embargo, cabe preguntarse qué fenómeno conecta a ambos eventos.

Un evento fisiológico que podría estar directamente conectado entre el tráfico de membranas y la activación de autofagia, es que la autofagia requiere del reclutamiento de membranas para la formación del fagóforo y posteriormente los autofagosomas, y tal como se mencionó en la introducción de este escrito (Introducción 2.3), la principal fuente de membrana para la formación de autofagosomas corresponde al ERGIC. Es posible plantear la posibilidad entonces de que la activación del R-KDEL y su vía de señalización en el AG produzca una respuesta de tráfico de membrana que favorezca un aumento el volumen del ERGIC para promover la formación de autofagosomas, sin embargo, esta posibilidad no ha sido abordada aún. Considerando lo anterior, es importante destacar que el aumento de número de autofagosomas está directamente relacionado con el concepto de actividad autofágica, que se define como la cantidad de material citoplasmático, ya sea componentes al azar o específicos, secuestrados por autofagosomas por unidad de tiempo, seguido por la posterior degradación. Está descrito que la actividad autofágica está modulada principalmente por dos factores; tamaño y número de autofagosomas (Jin y Klionsky, 2014), lo cual se relaciona directamente con los resultados obtenidos en esta tesis, en los que se aprecia un claro

aumento en el número de células con autofagosomas por la activación del R-KDEL (Figura 5).

Un punto interesante de los resultados obtenidos en esta tesis es el tiempo con el que se forman autofagosomas por la activación del R-KDEL. Se ha reportado que la formación de autofagosomas por inanición toma aproximadamente 2 a 4 horas (Sharifi et al., 2015). Sin embargo, la activación del R-KDEL aumenta la cantidad de autofagosomas en 15 minutos, como se muestra en la Figura 5. Sin embargo, cuando se inhibe tanto la ruta Gs o Gq, la formación de autofagosomas se ve disminuida con respecto al control, indicando que ambas vías son significativas para este fenómeno. Considerando el corto periodo de tiempo de esta respuesta, un control transcripcional es poco probable, lo que apunta a una regulación por activación o inhibición rápida de proteínas, y debido a las rutas río abajo del R-KDEL, posiblemente por fosforilación.

Una forma de regulación de autofagia por fosforilación es el caso de la proteína ULK1, que es una serina/treonina quinasa esencial para reclutar la maquinaria río abajo de proteínas Atg al sitio de formación de autofagosomas, por lo tanto, controlando la formación de autofagosomas. De forma interesante, ULK1, mAtg13, FIP200 y Atg101 forman un complejo estable independiente de las condiciones nutricionales para favorecer el inicio de autofagia (Mizushima 2010). Sin embargo, a la fecha se ha reportado que la activación del complejo ULK1 es mediante fosforilación por la Proteína Quinasa dependiente de AMP (AMPK), y queda por evaluar si PKA fosforila ULK1 (Wong et al., 2013). Considerando la ruta del R-KDEL que involucra la regulación de PKA por la proteína Gs del AG (Figura 1), es que ULK1 resulta un candidato interesante a considerar para esta respuesta de autofagia rápida dada por la activación del R-KDEL.

En mamíferos, existe solamente un estudio reportado que vincula a PKA y autofagia, favoreciendo positivamente la formación de autofagosomas (Mavrakis et al., 2006). En este estudio se demuestra que ratones con el gen *PRKAR1A* silenciado (ratones *prkar1a* *-/-*), que codifica para la subunidad reguladora 1-alfa ($R1\alpha$) de la holoenzima proteína quinasa A dependiente de AMPc (PKA), presentan un número considerablemente bajo de autofagosomas en células de fibroblasto embrionario (Fibroblastos embrionarios de ratón; MEFs) con respecto a la cantidad de autofagosomas en MEFs WT. Experimentos bioquímicos en este estudio dieron cuenta de que $R1\alpha$ interactúa con mTOR y disminuye considerablemente su actividad quinasa, lo que

conlleva que mTOR no ejerza su función inhibitoria de autofagia. Está reportado que cambios en la señalización de mTORC1 en respuesta a inanición se correlaciona con el reposicionamiento de lisosomas a la región perinuclear para modular la función de autofagia (Korolchuk y Rubinsztein, 2011); resultado que también fue apreciado en esta tesis en los experimentos de activación del R-KDEL que conllevan a la fusión de autofagosomas con lisosomas, pero, de forma interesante, esto ocurre sin inanición y en un corto tiempo (Figura 9). Este evento se justifica por la estimulación de PKA para fosforilar a DynLRB1, lo que conlleva a la destinación de lisosomas a la zona perinuclear.

Por otra parte, la ruta R-KDEL/Gq también indica tener una implicancia tanto en la activación de autofagia como también en la formación de autolisosomas. Como se mencionó anteriormente, la ruta Gq en el AG activa a la quinasa src para regular el tráfico anterógrado desde el AG al resto de la célula. Por lo tanto, src es un posible candidato para comprender la regulación de autofagia observada cuando se activa al R-KDEL. No obstante, experimentos de inactivación de src mediante un inhibidor específico (PP2) resulta en un aumento de autofagia, y además ha sido demostrado en músculo que src fosforila a mTOR para inhibir autofagia (Pal et al., 2014). Sin embargo, la ruta R-KDEL/Gq también induce indirectamente la activación de PKD. Esto resulta relevante, ya que se ha reportado que PKD es un activador de la maquinaria de autofagia. PKD interactúa directamente y fosforila a VPS34, quinasa necesaria para la fosforilación de lípidos en la formación de autofagosomas (Eisenberg-Lerner y Kimchi, 2012). Cabe destacar que la ruta Gβγ del R-KDEL se ha propuesto también como un activador de PKD en el AG. Se ha reportado que el complejo βγ de proteínas G en el AG promueven la activación de Fosfolipasa C, cuya función es necesaria para la subsecuente activación de PKC y PKD (Cancino et al., 2013). Por lo tanto, es probable que la implicancia de la ruta Gq en la regulación de autofagia R-KDEL esté asociada a un mecanismo por PKD, el cual queda por ser dilucidado. Lo anterior, sin excluir además la posible participación de Gβγ en el control de autofagia.

Hasta la fecha, solamente había sido descrita una participación del R-KDEL en autofagia en experimentos de sobreexpresión del receptor donde se apreció la activación de ERK, quinasa involucrada en la activación de autofagia (Wang et al., 2011). Sin embargo, la interacción directa de R-KDEL con ERK no fue demostrada, y

tampoco se ha propuesto una ruta de señalización para este fenómeno. No obstante, experimentos de expresión de la forma ligando-defectuosa (R169N) y transporte-defectuosa (D193N) del R-KDEL (Pulvirenti et al., 2008) son incapaces de gatillar autofagia (Wang et al., 2011), lo cual muestra que, tanto las propiedades receptor-ligando como las de señalización del R-KDEL son necesarias para inducir autofagia. El trabajo de esta tesis, por lo tanto, plantea una ruta de señalización acorde a los reportes de activación de autofagia por R-KDEL. Además, demuestra la implicancia de la activación de DynLRB1 por la ruta Gs/PKA para la fusión de autofagosomas con lisosomas.

Diversas enfermedades neurodegenerativas tienen en común el factor de acumulación de proteínas que terminan siendo tóxicas para la célula, ya que afectan a diferentes procesos fisiológicos, como son la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, Huntington y Esclerosis Lateral Amiotrófica (Nah et al., 2015). En el caso de la enfermedad de Alzheimer, se ha reportado la formación y acumulación de vesículas autofágicas inmaduras, atribuido a un defecto en la fusión de autofagosomas con lisosomas. Por lo tanto, la información que provee esta tesis sobre el mecanismo de formación de autolisosomas puede servir para futuras investigaciones en esta patología, con el fin de plantear nuevas propuestas para el tratamiento de esta enfermedad.

8. CONCLUSIONES

En esta tesis se demuestra un nuevo rol de la señalización mediada por el R-KDEL como modulador positivo de inducción de autofagia.

Hemos demostrado que las vías río abajo del R-KDEL, Gs y Gq, son necesarias para la formación de autofagosomas inducida por la activación del R-KDEL. La inhibición selectiva de Gs o Gq inhibe la formación de autofagosomas. Sin embargo, el mecanismo detrás de esta regulación necesita aun mayor investigación para establecer la contribución relativa de cada una de las vías.

La evidencia presentada en esta tesis permite establecer que ambas rutas son relevantes para la fusión de autofagosomas con lisosomas. En el caso particular de Gs, la evidencia disponible permite sugerir que la activación de PKA lleva a la fosforilación de DynLRB1 en la Serina 73 para inducir el reposicionamiento de lisosomas al espacio perinuclear, lo que resulta en su fusión con autofagosomas. Sin embargo, el mecanismo de la ruta Gq para favorecer este proceso aún queda por ser determinado y está sujeto a futuras investigaciones.

Por último, considerando que el R-KDEL se activa fisiológicamente por el tráfico desde el RE al AG, se podría sugerir fuertemente que el tráfico vesicular gatilla autofagia, y con esto, se reporta por primera vez que esta comunicación inter-organelos coordina dos procesos celulares que, aparentemente, son necesarios el uno del otro y estarían regulando de esta forma la homeostasis celular.

9. PROYECCIONES

Debido a la regulación directa que existe entre este R-KDEL y la autofagia, es que este receptor resulta en un blanco importante para poder potenciar o inhibir autofagia en el tratamiento de diversas patologías en las cuales este proceso se ve afectado, como lo son las enfermedades neurodegenerativas o cáncer. En el caso de enfermedades neurodegenerativas, existen diversos reportes en los que la autofagia se ve afectada, y esto conlleva a la acumulación de proteínas que pueden formar agregados que resultan citotóxicos. Por lo tanto, el trabajo de esta tesis puede servir como una base para futuras investigaciones en las cuales se busque la modulación de formación de autofagosomas o de autolisosomas dependiendo del proceso que esté siendo afectado, o que se quiera potenciar.

Por último, cabe destacar que los GPCRs son uno de los principales blancos farmacológicos de los compuestos utilizados regularmente en el tratamiento de enfermedades. Por todo lo anterior, es que el R-KDEL y su ruta de señalización en el AG corresponde a un blanco de estudio muy relevante, no solamente por sus fines terapéuticos, sino que también por la formación de una nueva beta de investigación debido al importante impacto que posee este receptor en la regulación coordinada entre distintos organelos, y su rol en la mantención de la homeostasis celular.

10. REFERENCIAS

- Appelqvist, H., Waster, P., Kagedal, K., y Ollinger, K. (2013). The lysosome: from waste bag to potential therapeutic target. *J Mol Cell Biol* 5, 214-226.
- Axe, E.L., Walker, S.A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H.L., Habermann, A., Griffiths, G., y Ktistakis, N.T. (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 182, 685-701.
- Ballabio, A. (2009). Disease pathogenesis explained by basic science: lysosomal storage diseases as autophagocytic disorders. *Int J Clin Pharmacol Ther* 47 Suppl 1, S34-38.
- Ballabio, A., y Gieselmann, V. (2009). Lysosomal disorders: from storage to cellular damage. *Biochim Biophys Acta* 1793, 684-696.
- Bossard, C., Bresson, D., Polishchuk, R.S., y Malhotra, V. (2007). Dimeric PKD regulates membrane fission to form transport carriers at the TGN. *J Cell Biol* 179, 1123-1131.
- Cabukusta, B., & Neefjes, J. (2018). Mechanisms of lysosomal positioning and movement. *Traffic*.
- Campbell, T. y Choy, F. (2001). The Effect of pH on Green Fluorescent Protein: a Brief Review. *Molecular Biology Today*, 2(1): 1-4.
- Cancino, J., Capalbo, A., Di Campi, A., Giannotta, M., Rizzo, R., Jung, J.E., Di Martino, R., Persico, M., Heinklein, P., Sallese, M., et al. (2014). Control systems of membrane transport at the interface between the endoplasmic reticulum and the Golgi. *Dev Cell*.
- Cancino, J., Capalbo, A., y Luini, A. (2013). Golgi-dependent signaling: self-coordination of membrane trafficking. *Methods Cell Biol* 118, 359-382.
- Cancino, J., Jung, J.E., y Luini, A. (2013). Regulation of Golgi signaling and trafficking by the KDEL receptor. *Histochem Cell Biol* 140, 395-405.
- Cancino, J., y Luini, A. (2013). Signaling circuits on the Golgi complex. *Traffic* 14, 121-134.
- Carroll, B., Mohd-Naim, N., Maximiano, F., Frasa, M.A., McCormack, J., Finelli, M., Thoresen, S.B., Perdios, L., Daigaku, R., Francis, R.E., et al. (2013). The TBC/RabGAP Armus coordinates Rac1 and Rab7 functions during autophagy. *Dev Cell* 25, 15-28.
- Cherra, S. J., Kulich, S. M., Uechi, G., Balasubramani, M., Mountzouris, J., Day, B. W., y Chu, C. T. (2010). Regulation of the autophagy protein LC3 by phosphorylation. *Journal of Cell Biology*, 190(4), 533-539.
- Codogno, P. y Meijer, A. J. (2006). Atg5: More than an autophagy factor. *Nature Cell Biology*, 8(10), 1045-1047.
- De Matteis, M.A., y Luini, A. (2011). Mendelian disorders of membrane trafficking. *N Engl J Med* 365, 927-938.
- Deter, R.L., Baudhuin, P., y De Duve, C. (1967). Participation of lysosomes in cellular autophagy induced in rat liver by glucagon. *J Cell Biol* 35, C11-16.
- Efeyan, A., Zoncu, R., y Sabatini, D.M. (2012). Amino acids and mTORC1: from lysosomes to disease. *Trends Mol Med* 18, 524-533.

- Eisenberg-Lerner, A., & Kimchi, A. (2012). PKD is a kinase of Vps34 that mediates ROS-induced autophagy downstream of DAPk. *Cell Death and Differentiation*, 19(5), 788–797.
- Farhan, H., y Rabouille, C. (2011). Signalling to and from the secretory pathway. *J Cell Sci* 124, 171-180.
- Giannotta, M., Ruggiero, C., Grossi, M., Cancino, J., Capitani, M., Pulvirenti, T., Consoli, G.M., Geraci, C., Fanelli, F., Luini, A., et al (2012). The KDEL receptor couples to Galphaq/11 to activate Src kinases and regulate transport through the Golgi. *EMBO J* 31, 2869-2881.
- Graef, M., Friedman, J.R., Graham, C., Babu, M., y Nunnari, J. (2013). ER exit sites are physical and functional core autophagosome biogenesis components. *Mol Biol Cell* 24, 2918-2931.
- Ge, L., Melville, D., Zhang, M., y Schekman, R. (2013). The ER-Golgi intermediate compartment is a key membrane source for the LC3 lipidation step of autophagosome biogenesis. *Elife* 2, e00947.
- Ge, L., Schekman, R. (2014). The ER-Golgi intermediate compartment feeds the phagophore membrane. *Autophagy* 10, 170-172.
- Hailey, D.W., Rambold, A.S., Satpute-Krishnan, P., Mitra, K., Sougrat, R., Kim, P.K., y Lippincott-Schwartz, J. (2010). Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* 141, 656-667.
- Hamasaki, M., Furuta, N., Matsuda, A., Nezu, A., Yamamoto, A., Fujita, N., Oomori, H., Noda, T., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., et al. (2013). Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature* 495, 389-393.
- Hansen, T. E., y Johansen, T. (2011). Following autophagy step by step. *BMC Biology*, 9, 39.
- He, S., O'Connell, D., Zhang, X., Yang, Y., y Liang, C. (2014). The intersection of Golgi-ER retrograde and autophagic trafficking. *Autophagy* 10, 180-181.
- Hirschberg, K., Miller, C.M., Ellenberg, J., Presley, J.F., Siggia, E.D., Phair, R.D., y Lippincott-Schwartz, J. (1998). Kinetic analysis of secretory protein traffic and characterization of golgi to plasma membrane transport intermediates in living cells. *J Cell Biol* 143, 1485-1503.
- Hung, Y.H., Chen, L.M., Yang, J.Y., y Yang, W.Y. (2013). Spatiotemporally controlled induction of autophagy-mediated lysosome turnover. *Nat Commun* 4, 2111.
- Hu, J., Wang, Y., Zhang, X., Lloyd, J.R., Li, J. H., Karpiak, J., Costanzi, S., Wess, J. (2010). Structural basis of G protein–coupled receptor–G protein interactions. *Nature Chemical Biology*, 6(7), 541–548.
- Jin, M., y Klionsky, D. J. (2014). Regulation of autophagy: Modulation of the size and number of autophagosomes. *FEBS Letters*.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing, 19(21).
- Katritch, V., Cherezov, V., y Stevens, R. C. (2013). Structure-Function of the G Protein – Coupled Receptor Superfamily. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2013. 53, 531–56.
- Kim, S., Naylor, S.A., y DiAntonio, A. (2012). Drosophila Golgi membrane protein Ema promotes autophagosomal growth and function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, E1072-1081.
- Korolchuk, V. I., y Rubinsztein, D. C. (2011). Regulation of autophagy by lysosomal positioning. *Autophagy*, 7:8, 927-928.

- Lamb, C. A., Yoshimori, T., & Tooze, S. A. (2013). The autophagosome: Origins unknown, biogenesis complex. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.
- Lagerstrom, M.C., Schioth, H.B. (2008). Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 339–57.
- Lefkowitz, R. J. (2000). The superfamily of hepatelical receptors. *Nature Cell Biol.*, 2 (July), E133–E136.
- Lewis, M.J., y Pelham, H.R. (1990). A human homologue of the yeast HDEL receptor. *Nature* 348, 162-163.
- Lewis, M.J., y Pelham, H.R. (1992). Ligand-induced redistribution of a human KDEL receptor from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Cell* 68, 353-364.
- Lewis, M.J., Sweet, D.J., y Pelham, H.R. (1990). The ERD2 gene determines the specificity of the luminal ER protein retention system. *Cell* 61, 1359-1363.
- Li, X., Rydzewski, N., Hider, A., Zhang, X., Yang, J., Wang, W., Gao, Q., Cheng, X., Xu, H. (2016). A molecular mechanism to regulate lysosome motility for lysosome positioning and tubulation. *Nature Cell Biology*, (October 2015).
- Liljedahl, M., Maeda, Y., Colanzi, A., Ayala, I., Van Lint, J., and Malhotra, V. (2001). Protein kinase D regulates the fission of cell surface destined transport carriers from the trans-Golgi network. *Cell* 104, 409-420.
- Luzio, J.P., Pryor, P.R., y Bright, N.A. (2007). Lysosomes: fusion and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 622-632.
- Luzio, J.P., Hackmann, Y., Dieckmann, N.M., Griffiths, G.M. (2014) The biogenesis of lysosomes and lysosome-related organelles. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014; 6:a016840.
- Mavrikakis, M., Lippincott-Schwartz, J., Stratakis, C. A., & Bossis, I. (2006). Depletion of type IA regulatory subunit (R1 α) of protein kinase A (PKA) in mammalian cells and tissues activates mTOR and causes autophagic deficiency. *Human Molecular Genetics*, 15(19), 2962–2971.
- Mironov, A.A., Beznoussenko, G.V., Nicoziani, P., Martella, O., Trucco, A., Kweon, H.S., Di Giandomenico, D., Polishchuk, R.S., Fusella, A., Lupetti, P., et al. (2001). Small cargo proteins and large aggregates can traverse the Golgi by a common mechanism without leaving the lumen of cisternae. *J Cell Biol* 155, 1225-1238.
- Nah, J., Yuan, J., & Jung, Y.-K. (2015). Autophagy in neurodegenerative diseases: from mechanism to therapeutic approach. *Molecules and Cells*, 38(5), 381–389.
- Nixon, R.A. (2013). The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat Med* 19, 983-997.
- Ohashi, Y., Munro, S. (2010). Membrane delivery to the yeast autophagosome from the Golgi-endosomal system. *Mol Biol Cell* 21, 3998-4008.
- Pal, R., Palmieri, M., Loehr, J. A., Li, S., Abo-Zahrah, R., Monroe, T. O., ... Rodney, G. G. (2014). Src-dependent impairment of autophagy by oxidative stress in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Nature Communications*, 5.
- Pelham, H.R. (1988). Evidence that luminal ER proteins are sorted from secreted proteins in a post-ER compartment. *Embo J* 7, 913-918.

Pulvirenti, T., Giannotta, M., Capestrano, M., Capitani, M., Pisanu, A., Polishchuk, R.S., San Pietro, E., Bezoussenko, G.V., Mironov, A.A., Turacchio, G., et al. (2008). A traffic-activated Golgi-based signalling circuit coordinates the secretory pathway. *Nat Cell Biol* 10, 912-922.

Puri, C., Renna, M., Bento, C.F., Moreau, K., y Rubinsztein, D.C. (2013). Diverse autophagosome membrane sources coalesce in recycling endosomes. *Cell* 154, 1285-1299.

Puri, C., Renna, M., Bento, C.F., Moreau, K., y Rubinsztein, D.C. (2014). ATG16L1 meets ATG9 in recycling endosomes: additional roles for the plasma membrane and endocytosis in autophagosome biogenesis. *Autophagy* 10, 182-184.

Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., et al., editors. *Neuroscience*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2001.

Ravikumar, B., Moreau, K., Jahreiss, L., Puri, C., and Rubinsztein, D.C. (2010). Plasma membrane contributes to the formation of preautophagosomal structures. *Nat Cell Biol* 12, 747-757.

Roberts, A. J., Kon, T., Knight, P. J., Sutoh, K. & Burgess, S. A. Functions and mechanics of dynein motor proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 713-726, doi:10.1038/nrm3667 (2013).

Roczniak-Ferguson, A., Petit, C.S., Froehlich, F., Qian, S., Ky, J., Angarola, B., Walther, T.C., y Ferguson, S.M. (2012). The transcription factor TFEB links mTORC1 signaling to transcriptional control of lysosome homeostasis. *Sci Signal* 5, ra42.

Roy, E., Bruyere, J., Flamant, P., Bigou, S., Ausseil, J., Vitry, S., and Heard, J.M. (2012). GM130 gain-of-function induces cell pathology in a model of lysosomal storage disease. *Hum Mol Genet* 21, 1481-1495.

Sallese, M., Pulvirenti, T., y Luini, A. (2006). The physiology of membrane transport and endomembrane-based signalling. *EMBO J* 25, 2663-2673.

Settembre, C., Di Malta, C., Polito, V.A., Garcia Arencibia, M., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S.U., Huynh, T., Medina, D., Colella, P., et al. (2011). TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science* 332, 1429-1433.

Settembre, C., Zoncu, R., Medina, D.L., Vetrini, F., Erdin, S., Huynh, T., Ferron, M., Karsenty, G., Vellard, M.C., Facchinetti, V., et al. (2012). A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *Embo J* 31, 1095-1108.

Settembre, C., Fraldi, A., Medina, D.L., y Ballabio, A. (2013). Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 283-296.

Sharifi, M. N., Mowers, E. E., Drake, L. E., & Macleod, K. F. (2015). Measuring autophagy in stressed cells. In *Stress Responses: Methods and Protocols* (pp. 129–150).

Shen, H.M., y Mizushima, N. (2014). At the end of the autophagic road: an emerging understanding of lysosomal functions in autophagy. *Trends Biochem Sci* 39, 61-71.

Solis, G. P., Bilousov, O., Koval, A., Lüchtenborg, A. M., Lin, C., & Katanaev, V. L. (2017). Golgi-Resident Gao Promotes Protrusive Membrane Dynamics. *Cell*, 170(5), 939–955.e24.

Stolz, A., Ernst, A., & Dikic, I. (2014). Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nature Cell Biology*.

Tanida, I., Ueno, T., y Kominami, E. (2008). LC3 and autophagy. *Methods in Molecular Biology*, 445(2), 77–88.

Tapia D, Jiménez T, Zamora C, Espinoza J, Rizzo R, González-Cárdena A, Fuentes D, Hernández S, Cavieres V, Soza A, Guzmán F, Arriagada G, Yuseff MI, Mardones GA, Burgos PV, Luini A, González A and Cancino J. KDEL receptor regulates secretion by lysosome relocation- and autophagy-dependent modulation of lipid-droplet turnover. *Nat. Commun.* 2018 (in press).

Townsend, F.M., Wilson, D.W., y Pelham, H.R. (1993). Mutational analysis of the human KDEL receptor: distinct structural requirements for Golgi retention, ligand binding and retrograde transport. *EMBO J* 12, 2821-2829.

Trucco, A., Polishchuk, R.S., Martella, O., Di Pentima, A., Fusella, A., Di Giandomenico, D., San Pietro, E., Beznoussenko, G.V., Polishchuk, E.V., Baldassarre, M., et al. (2004). Secretory traffic triggers the formation of tubular continuities across Golgi subcompartments. *Nat Cell Biol* 6, 1071-1081.

Wang, P., Li, B., Zhou, L., Fei, E., y Wang, G. (2011). The KDEL receptor induces autophagy to promote the clearance of neurodegenerative disease-related proteins. *Neuroscience* 190, 43-55.

White, E. (2012). Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 12, 401-410.

Wilson, C., Venditti, R., Rega, L.R., Colanzi, A., D'Angelo, G., y De Matteis, M.A. (2010). The Golgi apparatus: an organelle with multiple complex functions. *Biochem J* 433, 1-9.

Yang, Z.J., Chee, C.E., Huang, S., y Sinicrope, F.A. (2011). The role of autophagy in cancer: therapeutic implications. *Mol Cancer Ther* 10, 1533-1541.

Zoncu, R., Bar-Peled, L., Efeyan, A., Wang, S., Sancak, Y., y Sabatini, D.M. (2011). mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase. *Science* 334, 678-683.